



Universidade de Brasília
Pós-Graduação em Patologia Molecular

Investigação de marcadores moleculares relacionados à recaída e estudo do microambiente tumoral em leucemias linfoblásticas agudas de células B com alterações recorrentes de prognóstico favorável.

Aluna: Marina da Costa Ribeiro
Brasília, DF
2025

Marina da Costa Ribeiro

Investigação de marcadores moleculares relacionados à recaída e estudo do microambiente tumoral em leucemias linfoblásticas agudas de células B com alterações recorrentes.

Orientador: Ciro Martins Gomes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília, DF

2025

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais, por sempre me apoiarem e me incentivarem, e por todo o amor incondicional que sempre tive a honra de viver. À minha mãe, que plantou em mim a semente da pesquisa desde cedo, e ao meu pai, que me ensinou que tudo na vida deve ser feito com amor.

À minha irmã, Helena, agradeço por ser abrigo nos dias difíceis, por me mostrar que a vida se torna mais leve quando é compartilhada, e por ser meu porto seguro, mesmo sendo minha caçulinha.

Às minhas melhores amigas, Viviann, Ana Luiza, Luiza, Luana e Melina, que nunca soltaram a minha mão e sempre foram fonte inesgotável de amor, apoio e força em cada passo que dei.

Ao João, por todo apoio, parceria e compreensão nas fases difíceis, e por sempre celebrar comigo cada pequena vitória.

Ao meu orientador, Ciro Gomes, agradeço a oportunidade de realizar este mestrado e trilhar este caminho.

À Bruna Guido, minha eterna gratidão, pela chance de realizar este mestrado com um projeto tão relevante, por todo o suporte em cada etapa, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo acolhimento nos dias difíceis. Sem você, nada disso teria sido possível.

Ao Ricardo Camargo, que há alguns anos enxergou potencial em mim e me deu oportunidades para crescer, profissional e academicamente. Se hoje sou quem sou profissionalmente, devo muito a ele.

Ao Agenor de Castro, meu sincero agradecimento pelo apoio incondicional, orientação, conselhos que me acalmaram e por acreditar em mim até nos momentos em que nem eu mesma acreditava.

Ao Lucas Souza, meu parceiro de todos os dias, que me ouviu incansavelmente, me estendeu a mão em cada tropeço e me ajudou de todas as formas possíveis. Obrigada por ser minha dupla.

À Robéria Pontes, por ter plantado em mim a sementinha da citometria de fluxo e por ter sido essencial para a realização da porção de microambiente deste projeto.

Ao Brenno Martins, por iluminar o mundo da bioinformática para mim. Obrigada por ter tornado essa parte do projeto possível.

Aos queridos Marina Simões e Paschoal Rossetti, alunos mais do que dedicados, foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer a toda a equipe do Laboratório de Pesquisa Translacional (Anna Carolina Dias, Tatiana Rusch, Stefany Mendes, Suzany Almeida, Micael Lima, Larissa Lemos, Rebeca Lima, Carolyn Victoria e Aldemiro Jorge – in memoriam). Sem vocês, os dias seriam mais pesados. Que privilégio é poder aprender diariamente com cada um, dividir anseios, risadas e conquistas. Vocês tornam tudo mais leve.

Ao Hospital da Criança de Brasília, minha casa há quase cinco anos, obrigada por me permitir não só conquistar este título, mas também por me mostrar, todos os dias, o real valor da vida.

À Universidade de Brasília (UnB), cuja estrutura e programa de pós-graduação foram essenciais para a obtenção deste título.

E, por fim, meu mais profundo agradecimento às crianças e aos seus responsáveis, que, de forma tão altruísta, permitiram a participação na pesquisa e, mais do que isso, me ensinaram diariamente sobre luta, persistência e resiliência. Tudo é, e sempre será, por vocês.

“Nada na vida deve ser
temido, apenas compreendido.
Agora é hora de compreender
mais, para temer menos.”

- Marie Curie

Lista de Figuras

Figura 1. Hematopoiese normal e leucêmica. Criado em: https://BioRender.com	22
Figura 2. Microambiente medular em contexto leucêmico e papel dos adipócitos, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e mesenquimais na manutenção das células leucêmicas. Adaptado de: Panting, Kotecha e Cheung, (2024). Criado em: https://BioRender.com	30
Figura 3. (A) Linha do tempo dos métodos de avaliação da resposta terapêutica e dos protocolos de tratamento utilizados no Hospital da Criança de Brasília (HCB) entre 2012 e 2022. Até 2018, a resposta foi avaliada exclusivamente por mielograma, com introdução da detecção de doença residual mínima (DRM) por citometria de fluxo a partir de 2018 e implementação dos painéis EuroFlow em 2019. Os protocolos terapêuticos utilizados variaram ao longo do período: GBTLI93 até maio de 2015, BFM95 e GBTLI99 entre 2015 e 2019, BFM até agosto de 2022 e GBTLI2021 a partir de setembro de 2022. (B) Distribuição das amostras incluídas nas análises moleculares, indicando o número de amostras de diagnóstico e de recaída submetidas ao sequenciamento de nova geração (NGS) e à <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA), bem como aquelas utilizadas para avaliação do microambiente medular.	37
Figura 4. Fluxograma das etapas de triagem, confirmação diagnóstica e encaminhamento das amostras para análises complementares, incluindo as análises do perfil das células estromais no microambiente medular e o sequenciamento de nova geração.	38
Figura 5. Os painéis A–H ilustram como as células estromais da medula óssea (EC – pontos azuis e MSC – pontos lilás) foram especificamente identificadas e classificadas após coloração com o painel de anticorpos EuroFlow BCP-ALL MRD.	43
Figura 6. Distribuição dos 132 pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-B dos subtipos de interesse do estudo, entre janeiro de 2012 e dezembro de 2022 segundo o sexo, evidenciando 56,8% (n = 75) do sexo masculino e 43,2% (n = 57) do sexo feminino.	48
Figura 7. Distribuição dos 132 pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse do estudo entre 2012 e 2022 segundo o estado de origem, mostrando que 55,3% (n = 72) eram originários do Distrito Federal e 44,7% (n = 59) de outros sete estados brasileiros.	48
Figura 8. Frequência dos genótipos de bom prognóstico na coorte de 132 pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse entre 2012 e 2022: fusão <i>ETV6::RUNX1</i> em 52,3% (exclusiva em 47,7%, n = 63; concomitante com aneuploidias em 4,6%, n = 6), fusão <i>TCF3::PBX1</i> em 15,9% (n = 21) e alta hiperdiploidia em 31,8% (n = 42).	50

Figura 9. Distribuição dos 132 pacientes com LLA-B entre 2012 e 2022 por sexo em cada genótipo de bom prognóstico. No grupo *ETV6::RUNX1* exclusiva, 47,6% eram do sexo feminino e 52,4% do masculino; na fusão *TCF3::PBX1*, 52,4% do sexo feminino e 47,6% do masculino; na alta hiperdiploidia exclusiva, 41% do sexo feminino e 59% do masculino..... 51

Figura 10. Número de pacientes com infiltração do sistema nervoso central (SNC) ao diagnóstico entre os 132 pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse avaliados entre 2012 e 2022. Ao diagnóstico, 6% (n = 8) apresentaram infiltração do SNC; um paciente não teve líquido avaliado por imunofenotipagem. A distribuição por genótipo inclui três pacientes com *ETV6::RUNX1*, um com *TCF3::PBX1* e quatro com alta hiperdiploidia. 52

Figura 11. Distribuição dos 132 pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse entre 2012 e 2022 segundo os protocolos de tratamento utilizados. Aproximadamente 20% foram tratados pelo protocolo GBTLI93, 2,3% pelo GBTLI99, 2,3% pelo GBTLI2021 e uma pequena parte recebeu múltiplos protocolos. A maior proporção da coorte seguiu protocolos do grupo Berlin-Frankfurt-Münster (BFM), sendo 43,9% com BFM95 e 29,5% com BFM2009..... 55

Figura 12. Classificação de risco dos 132 pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse, ao diagnóstico (A) e ao final da indução (B) segundo os protocolos utilizados e por genótipo. Ao diagnóstico, 39,4% foram classificados como baixo risco provisório, 31,1% como risco intermediário provisório, 16,7% como alto risco provisório e 12,9% não classificados. Ao final da indução, 25,8% estavam em baixo risco definitivo, 28% em risco intermediário definitivo, 15,9% em alto risco definitivo e 30,3% não classificados. 56

Figura 13. Distribuição dos pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse, diagnosticados entre 2012 e 2022 no Hospital da Criança de Brasília, por idade ao diagnóstico, onde a mediana foi de 4 anos (intervalo de 0 a 17 anos)..... 57

Figura 14. Distribuição dos pacientes com LLA-B, diagnosticados entre 2012 e 2022, no Hospital da Criança de Brasília por idade ao diagnóstico, segundo os genótipos de interesse do estudo. A mediana de idade foi de 3 anos para *ETV6::RUNX1*, 5 anos para *TCF3::PBX1*, 3,5 anos para alta hiperdiploidia e 7,5 anos para *ETV6::RUNX1* com aneuploidia..... 58

Figura 15. Distribuição dos pacientes com LLA-B por faixa de leucometria ao diagnóstico, segundo os genótipos de interesse dos pacientes diagnosticados com LLA-B, entre 2012 e 2022, no Hospital da Criança de Brasília. 59

Figura 16. A) Distribuição das recaídas totais entre os 132 pacientes com LLA-B diagnosticados com LLA-B, entre 2012 e 2022, no Hospital da Criança de Brasília segundo os

genótipos estudados. No total, 18,9% apresentaram recaída, com 28% das recaídas do grupo *ETV6::RUNX1*, 32% do grupo *TCF3::PBX1*, 36% do subtipo alta hiperdiploidia *ETV6::RUNX1* com aneuploidia. (B) Proporção de pacientes com recaída dentro de cada genótipo estudado..... 60

Figura 17. (A) Classificação das recaídas em precoces (<18 meses) ou tardias (≥18 meses) por genótipo entre os pacientes com LLA-B diagnosticados com LLA-B, entre 2012 e 2022, no Hospital da Criança de Brasília. No grupo *ETV6::RUNX1*, todas as recaídas ocorreram tardiamente; o mesmo padrão foi observado em alta hiperdiploidia e *ETV6::RUNX1* com aneuploidia. Em contraste, 85,7% das recaídas em *TCF3::PBX1* foram precoces. (B) Tempo médio até a recaída por genótipo: 3,34 anos para *ETV6::RUNX1*, 0,88 ano para *TCF3::PBX1*, 3,02 anos para alta hiperdiploidia e 2,8 anos para *ETV6::RUNX1* com aneuploidia..... 61

Figura 18. (A) Porcentagem de óbitos na coorte total de 132 pacientes diagnosticados com LLA-B, entre 2012 e 2022, no Hospital da Criança de Brasília. (B) Distribuição dos óbitos (porcentagem) por genótipo de interesse estudado. 62

Figura 19. Porcentagem de recaídas entre os pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse do estudo, diagnosticados entre 2012 e 2022 no Hospital da Criança de Brasília, segundo o protocolo de tratamento utilizado..... 65

Figura 20. Avaliação da doença residual mínima (DRM) em pacientes submetidos ao protocolo GBTLI93 ao D15 e D33, por genótipo. (A) Em pacientes com *ETV6::RUNX1*, 73% apresentaram <5% de blastos ao D15, com alguns casos entre 5–20% e acima de 20%. (B) Pacientes com alta hiperdiploidia tiveram resposta mais uniforme, com 80% apresentando <5% de blastos e nenhum acima desse limite. (C) No grupo *TCF3::PBX1*, cerca de 33% apresentaram DRM positiva (5–20% de blastos) ao D15. Ao D33, a 4 (66%) dos pacientes avaliados nos três subgrupos apresentou ausência de blastos, indicando resposta adequada, embora o número de pacientes avaliados tenha sido limitado, especialmente em *TCF3::PBX1*. 66

Figura 21. Avaliação da doença residual mínima (DRM) em pacientes submetidos ao protocolo BFM2009 ao D15, D33 e D78, por genótipo. (A) Em pacientes com *ETV6::RUNX1*, 13% apresentaram DRM indetectável ao D15, 30,4% entre 1–5% de blastos e 8,6% acima de 5%; 69,6% atingiram DRM indetectável ao D33 e 100% ao D78. (B) No grupo de alta hiperdiploidia, 7,1% apresentaram DRM indetectável ao D15, 57,1% entre 0,1–1%, 78,6% atingiram DRM indetectável ao D33 e 85,7% ao D78. (C) Em *TCF3::PBX1* (n = 3), ao D15 um

paciente apresentou DRM >5%; dois pacientes alcançaram DRM indetectável ao D33 e todos atingiram DRM indetectável ao D78.	68
Figura 22. Análise de PCA com base nos perfis de expressão de amostras rodadas em ambos os painéis, a fim de avaliar a concordância entre painéis e validar as análises conjunta de amostras avaliadas em painéis distintos.	69
Figura 23. Heatmap com amostras avaliadas pelo painel customizado, agrupadas de forma satisfatória de acordo com suas assinaturas de expressão gênica por subtipo: <i>ETV6::RUNX1</i> – tarja azul, <i>TCF3::PBX1</i> – tarja laranja e alta hiperdiploidia – tarja verde.	71
Figura 24. Perfil de expressão do <i>ZBTB16</i> em amostras de diagnóstico e recaída dos pacientes do subgrupo <i>ETV6::RUNX1</i> , onde observa-se uma maior expressão do gene nas amostras no momento do diagnóstico, com uma contagem de transcritos por milhão mais alta.	72
Figura 25. <i>Heatmap</i> de expressão gênica dos genes utilizados para agrupar amostras de diagnóstico e recaída de pacientes <i>TCF3::PBX1</i> . As colunas representam as amostras, e as linhas, os genes analisados. A intensidade da cor reflete os níveis de expressão gênica, com tons de vermelho indicando alta expressão, azul indicando baixa expressão e branco representando valores intermediários. Os dados foram normalizados por Z-score e analisados por clusterização hierárquica para identificar padrões de expressão.	73
Figura 26. Perfil de expressão do <i>WT1</i> em amostras do momento do diagnóstico de pacientes recaídos e não recaídos do subgrupo <i>TCF3::PBX1</i>	73
Figura 27. <i>Heatmap</i> de expressão de treze genes em amostras do momento do diagnóstico e da recaída. As colunas representam as amostras, e as linhas, os genes analisados. A intensidade da cor reflete os níveis de expressão gênica, com tons de vermelho indicando alta expressão, azul indicando baixa expressão e branco representando valores intermediários. Os dados foram normalizados por Z-score e analisados por clusterização hierárquica para identificar padrões de expressão.	74
Figura 28. <i>Heatmap</i> de expressão gênica de quatro genes em amostras de pacientes recaídos e não recaídos com alta hiperdiploidia. As colunas representam as amostras, e as linhas, os genes analisados. A intensidade da cor reflete os níveis de expressão gênica, com tons de vermelho indicando alta expressão, azul indicando baixa expressão e branco representando valores intermediários. Os dados foram normalizados por Z-score e analisados por clusterização hierárquica para identificar padrões de expressão.	75

Figura 29. Curva de probabilidade de sobrevida livre de eventos por D33ENDOCOMPART, de Kaplan-Meier, para pacientes pediátricos atendidos no serviço de Oncologia do HCB diagnosticados com LLA-B, no Laboratório de Pesquisa Translacional (LPT), de agosto de 2019 a dezembro de 2022..... 87

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais critérios utilizados para estratificação de risco na leucemia linfóide aguda B (LLA-B).....	23
Tabela 2. Painel de anticorpos para triagem de leucemias agudas (08 marcadores).....	41
Tabela 3. Painel de anticorpos para o diagnóstico de LLA B (25 marcadores).	41
Tabela 4. Painel de anticorpos para a detecção de DRM em pacientes com LLA B (18 marcadores).	42
Tabela 5. Frequência de alterações genético moleculares de casos de todos os subtipos de LLA-B diagnosticados no período de 2018-2022 no Hospital da Criança de Brasília, comparando suas frequências com as frequências descritas na literatura.	49
Tabela 8. Perfil molecular dos pacientes que tiveram recaída.	77
Tabela 8. Classificação de risco e alterações genético-moleculares nas amostras de pacientes que apresentaram recaída.	83

Lista de siglas e abreviações

BFM	Berlin-Frankfurt-Münster (Protocolo de Tratamento)
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa

D15	15° dia do início do protocolo de tratamento
D33	33° dia do início do protocolo de tratamento
D78	78° dia do início do protocolo de tratamento
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRM	Doença Residual Mínima
EC	Células Endoteliais
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization (Hibridização In Situ por Fluorescência)
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Infantil
HCB	Hospital da Criança de Brasília
HD	Hiperdiploidia
HSC	Hematopoietic Stem Cell (Célula-Tronco Hematopoética)
iAMP21	Amplificação intragênica do cromossomo 21
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LPT	Laboratório de Pesquisa Translacional
LSC	Leukemic Stem Cell (Célula-Tronco Leucêmica)
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MO	Medula Óssea
MSC	Mesenchymal Stem Cell (Célula-Tronco Mesenquimal)
NGS	Next-Generation Sequencing (Sequenciamento de Nova Geração)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
RBPC	Registro Brasileiro de Pacientes com Câncer
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA-Seq	RNA Sequencing (Sequenciamento de RNA)
ROC	Receiver Operating Characteristic (Curva ROC)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa)
SLE	Sobrevida Livre de Eventos
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Sangue Periférico
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VUS	Variant of Uncertain Significance (Variante de Significado Incerto)

Sumário

1	Introdução.....	20
1.1	Leucemia linfóide aguda	20
1.1.1	Diagnóstico e monitoramento	24
1.2	Subgrupos moleculares de bom prognóstico.....	26
1.2.1	Fusão <i>ETV6::RUNX1</i>	26
1.2.2	Fusão <i>TCF3::PBX1</i>	27
1.2.3	Alta hiperdiploidia.....	28
1.3	Microambiente tumoral	30
1.3.1	Células estromais.....	32
2	Justificativa	33
3	Objetivos	34
3.1	Objetivos gerais.....	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	Metodologia.....	34
4.1	Critérios de inclusão	34
4.2	Critérios de exclusão	35
4.3	Tecnologias disponíveis	35
4.4	Fluxograma de testagem para diagnóstico das LLA-B	37
4.5	Aspectos éticos	38
4.5.1	Consentimento informado	39
4.5.2	Manutenção do sigilo	39
4.6	Amostras.....	39
4.7	Diagnóstico da LLA B	39
4.8	Coleta de material, isolamento de mononucleares e extração de ácidos nucleicos..	40
4.9	Análise morfológica de MO	40

4.10	Imunofenotipagem	40
4.10.1	Monitoramento de DRM e avaliação do microambiente tumoral das LLA-B por citometria de fluxo	41
4.11	Estudos genéticos-moleculares	43
4.11.1	Isolamento de mononucleares e extração de ácidos nucleicos.....	43
4.11.2	Pesquisa de rearranjos recorrentes nas LLA-B por RT-PCR.....	43
4.11.3	Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA).....	44
4.11.4	Sequenciamento Genético de Nova Geração	44
4.12	Análise estatística	47
5	Resultados	47
5.1	Caracterização epidemiológica da coorte.....	47
5.2	Caracterização Genético Molecular	68
5.2.1	Expressão gênica diferencial por subgrupo molecular.....	71
5.2.2	Co ocorrências de alterações moleculares.....	75
5.3	Microambiente tumoral	85
6	Discussão	88
6.1	Caracterização epidemiológica da coorte.....	88
6.2	Análises genético-moleculares	95
6.2.1	Expressão gênica diferencial por subgrupo molecular.....	96
6.2.2	Co ocorrência de alterações moleculares	101
6.3	Microambiente tumoral	102
7	Conclusão	104
8	Perspectivas futuras	105
9	Referências	106

RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) é a neoplasia maligna mais comum na população pediátrica, caracterizada pela proliferação descontrolada de precursores linfoides imaturos. Dentre os subtipos de LLA-B, os classificados como de bom prognóstico, especialmente aqueles com as alterações genéticas *ETV6::RUNX1*, alta hiperdiploidia e *TCF3::PBX1*, apresentam desfechos clínicos favoráveis. Entretanto, a recaída ainda ocorre em uma parcela significativa desses pacientes, indicando a necessidade de melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à progressão da doença. O presente estudo teve como objetivo caracterizar clinicamente e molecularmente uma coorte pediátrica de pacientes com LLA-B com alterações de bom prognóstico, investigando alterações genéticas secundárias e perfis de expressão gênica associados à recaída, além de analisar a composição do microambiente medular e seu possível impacto no desfecho clínico. Para tanto, foram avaliadas amostras de pacientes submetidos a protocolos terapêuticos padronizados, utilizando técnicas de sequenciamento de RNA (RNA-seq) para análise diferencial de expressão gênica entre amostras de diagnóstico e recaída, bem como entre amostras do momento do diagnóstico de pacientes em remissão e aqueles que apresentaram recaída, além da pesquisa de fusões e chamada de variantes. Adicionalmente, foi realizada caracterização do microambiente medular por citometria de fluxo, com enfoque nas populações celulares estromais, endoteliais e mesenquimais. Os resultados evidenciaram diferenças significativas na expressão gênica entre diagnóstico e recaída em subtipos específicos, destacando genes associados a vias proliferativas, metabólicas, imunológicas e de interação com o microambiente, sugerindo mecanismos moleculares complexos envolvidos na progressão da LLA-B. Foram identificadas alterações genéticas secundárias relevantes, como deleções em *IKZF1*, *PAX5* e *CDKN2A/B*, além de variantes patogênicas em *CREBBP* e alterações na região PAR1, que podem contribuir para a resistência terapêutica e pior prognóstico. A análise do microambiente medular indicou uma tendência, ainda que não estatisticamente significativa, de associação entre maior proporção de células endoteliais e pior desfecho clínico, tendo como ponto de corte um valor maior que 14,15% de células endoteliais no compartimento de estromais. Não foram observadas diferenças expressivas na expressão gênica do microambiente entre os grupos com células endoteliais aumentadas e com níveis normais. Este estudo reforça a complexidade biológica da LLA-B de bom prognóstico e a importância do monitoramento genético contínuo para a identificação precoce de marcadores de risco. Apesar das limitações relativas ao tamanho amostral e à heterogeneidade dos dados, os achados destacam a necessidade de abordagens integrativas e individualizadas para aprimorar a estratificação de risco e o manejo terapêutico, contribuindo para a melhoria dos desfechos clínicos em pacientes pediátricos com LLA-B.

ABSTRACT

B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common malignant neoplasm in the pediatric population, characterized by the uncontrolled proliferation of immature lymphoid precursors. Among the *B-ALL* subtypes, those classified as good prognosis, especially cases harboring the genetic alterations *ETV6::RUNX1*, high hyperdiploidy, and *TCF3::PBX1*, typically present favorable clinical outcomes. However, relapse still occurs in a significant portion of these patients, highlighting the need for a better understanding of the molecular mechanisms underlying disease progression. This study aimed to clinically and molecularly characterize a pediatric cohort of B-ALL patients with good prognosis alterations, investigating secondary genetic changes and gene expression profiles associated with relapse, as well as analyzing the bone marrow microenvironment composition and its possible impact on clinical outcomes. Samples from patients treated under standardized therapeutic protocols were evaluated using RNA sequencing (RNA-seq) techniques for differential gene expression analysis between diagnostic and relapse samples, as well as between diagnostic samples of patients in remission and those who relapsed, in addition to fusion detection and variant calling. Additionally, bone marrow microenvironment characterization was performed by flow cytometry, focusing on stromal, endothelial, and mesenchymal cell populations. The results revealed significant differences in gene expression between diagnosis and relapse in specific subtypes, highlighting genes related to proliferative, metabolic, immune pathways, and interactions with the microenvironment, suggesting complex molecular mechanisms involved in B-ALL progression. Relevant secondary genetic alterations were identified, including deletions in *IKZF1*, *PAX5*, and *CDKN2A/B*, pathogenic variants in *CREBBP*, and alterations in the PAR1 region, which may contribute to therapeutic resistance and poorer prognosis. Analysis of the bone marrow microenvironment indicated a trend, although not statistically significant, of an association between a higher proportion of endothelial cells (cut-off: >14,15% of endothelial cells in the stromal compartment) and worse clinical outcome. No significant differences in gene expression of the microenvironment were observed between groups with increased endothelial cells and those with normal levels. This study reinforces the biological complexity of good prognosis B-ALL and the importance of continuous genetic monitoring for early identification of risk markers. Despite limitations related to sample size and data heterogeneity, the findings emphasize the need for integrative and individualized approaches to

improve risk stratification and therapeutic management, ultimately contributing to better clinical outcomes in pediatric B-ALL patients.

1 Introdução

1.1 Leucemia linfoide aguda

As leucemias são neoplasias na medula óssea, que surgem a partir da proliferação clonal de células-tronco hematopoiéticas, resultando no acúmulo de células imatura. Elas são classificadas em subtipos agudos ou crônicos, e conforme a linhagem celular, linfoide ou mieloide. A leucemia linfoide aguda (LLA) é o subtipo mais frequente na infância, enquanto os demais predominam em adultos. Entre os fatores de risco estão alterações genéticas hereditárias e exposições ambientais. Os sintomas iniciais são inespecíficos, como febre, cansaço e sangramentos (Davis, et al., 2014).

A incidência anual de leucemias, entre casos de adultos e crianças, é de 36,2 casos por 1 milhão de pessoas, com um pico de incidência entre dois e cinco anos de idade (nesta faixa, há mais de 90 casos por 1 milhão de pessoas) (Inaba e Pui, 2021). No Brasil, em um estudo de 2010, foram analisados dados de catorze Registros de Base Populacional de Câncer (RBPC) e observaram taxas de incidência de leucemia que variaram muito nas diferentes regiões do país, indo de 21 casos por milhão em Salvador a 67,5 casos por milhão em Goiânia (Camargo, De *et al.*, 2010). De acordo com as projeções do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o triênio 2020-2022, estimava-se a ocorrência de aproximadamente 10.810 novos casos de leucemia anuais (INCA, 2019). Já para o triênio de 2023 a 2025, as projeções do INCA (2023), preveem o registro de 11.540 casos novos de leucemias anuais no país.

A leucemia linfoide aguda (LLA) constitui um grupo heterogêneo de doenças neoplásicas, sendo o tipo mais comum de câncer em crianças e adolescentes. Essa doença representa aproximadamente 25% dos diagnósticos de câncer, e cerca de 60% de todos os casos ocorrem em crianças e adolescentes com menos de 20 anos. A depender da célula precursora onde ocorre o evento leucemogênico, a LLA pode ser classificada em LLA de células B precursoras (o subtipo mais frequente em crianças), LLA de células T precursoras e, mais raramente, leucemias bifenotípicas com características tanto de diferenciação T quanto B, ou ainda com expressão de antígenos mieloides (Bennett et al., 1976; Gu et al., 2019; Iacobucci & Mullighan, 2017).

A LLA pediátrica, é diagnosticada com mais frequência em meninos do que em meninas, com uma proporção de aproximadamente 1,3:1 e a sua incidência anual varia consideravelmente de acordo com a raça e o grupo étnico (Lim *et al.*, 2014). Isso demonstra

como estudos comparativos entre países desenvolvidos e em desenvolvimento são essenciais para compreender como diferenças ambientais, condições socioeconômicas e fatores de risco influenciam a incidência de câncer infantil, em especial, a leucemia. A análise de variações geográficas, sobretudo em populações geneticamente relacionadas, pode revelar associações etiológicas importantes e sustentar hipóteses sobre o impacto de exposições relacionadas ao estilo de vida no risco da doença (Feliciano, Santos e Pombo-de-Oliveira, 2019).

O componente genético das leucemias parece ter uma natureza poligênica, com genes envolvidos diretamente nos mecanismos de proliferação e diferenciação das células sanguíneas e envolvem alterações no número de cromossomos (hiperdiploidia ou hipodiploidia), rearranjos cromossômicos que impactam a expressão gênica ou levam à produção de proteínas de fusão, além de deleções, ganhos de DNA e mutações em sequências específicas do DNA (Harrison, 2009).

Estudos como o de Malard e Mohty (2020) sugerem que variantes genéticas herdadas podem aumentar a suscetibilidade das células hematopoiéticas, contribuindo para o início da tumorigênese ainda no período intrauterino ou nos primeiros anos de vida. No entanto, isoladamente, essas alterações genéticas não são, na maioria dos casos, suficientes para causar a doença. A interação dos fatores genéticos com fatores ambientais, infecciosos e imunológicos também desempenha um papel essencial no desenvolvimento da LLA, contribuindo para o acúmulo de alterações somáticas. Nesse contexto, a caracterização dessas mutações adquiridas, sobretudo aquelas com potencial papel oncogênico, tornou-se essencial para a compreensão da biologia da doença.

O surgimento sequenciamento de nova geração (NGS) tornou possível detectar inúmeras mutações em tumores, embora apenas uma fração atue diretamente na transformação maligna. As *driver mutations* conferem vantagem proliferativa e impulsionam o desenvolvimento tumoral, ao passo que as *passenger mutations* são neutras isoladamente, mas podem influenciar o fenótipo tumoral de forma cumulativa ou em certos contextos genéticos. Quando mutações *driver* em um gene ocorrem repetidamente em um mesmo subtipo, esse gene passa a ser reconhecido como um *driver gene* daquela neoplasia. A identificação precisa desses eventos é fundamental para a compreensão da biologia tumoral e o desenvolvimento de terapias direcionadas (Pon e Marra, 2015).

Em leucemias, a identificação dessas alterações *drivers* é ainda mais relevante devido à dinâmica evolutiva da doença, marcada pela diversidade clonal. Estudos comparando amostras

de diagnóstico e recidiva revelam que a progressão da leucemia linfóide aguda envolve alterações genômicas significativas, como o surgimento de novas variantes ou a perda de lesões iniciais. Apesar dessas modificações, translocações cromossômicas e certas alterações no número de cópias de DNA geralmente permanecem estáveis ao longo do tempo. Tecnologias atuais permitem detectar, já no diagnóstico, mutações que podem permanecer até a recidiva, sugerindo que as células da LLA derivam de um clone "pré-leucêmico" comum, que evolui por diferentes caminhos. O tratamento influencia essa evolução ao eliminar certos clones sensíveis à terapia e favorecer o surgimento de subclones mais resistentes (Hunger & Mullighan, 2015b).

Dentre os subtipos de leucemia linfoblástica aguda, a LLA de células B (LLA-B) é a mais prevalente, especialmente em crianças, representando cerca de 80% dos casos pediátricos (Inaba *et al.*, 2025). Essa predominância justifica o grande número de estudos voltados à compreensão de suas características clínicas, genéticas e moleculares. A LLA-B é caracterizada pela proliferação maligna de precursores linfóides B imaturos na medula óssea.

Células linfóides se desenvolvem a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes na medula óssea, passando por estágios como células pro-B, pré-B e B maduras. Em condições normais, a maturação dessas células é controlada por fatores de transcrição e sinais celulares. Porém, na leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B), mutações genéticas impedem a diferenciação normal das células, promovendo proliferação anormal e sobrevivência de células malignas como visto na figura 1 (Huang *et al.*, 2020).

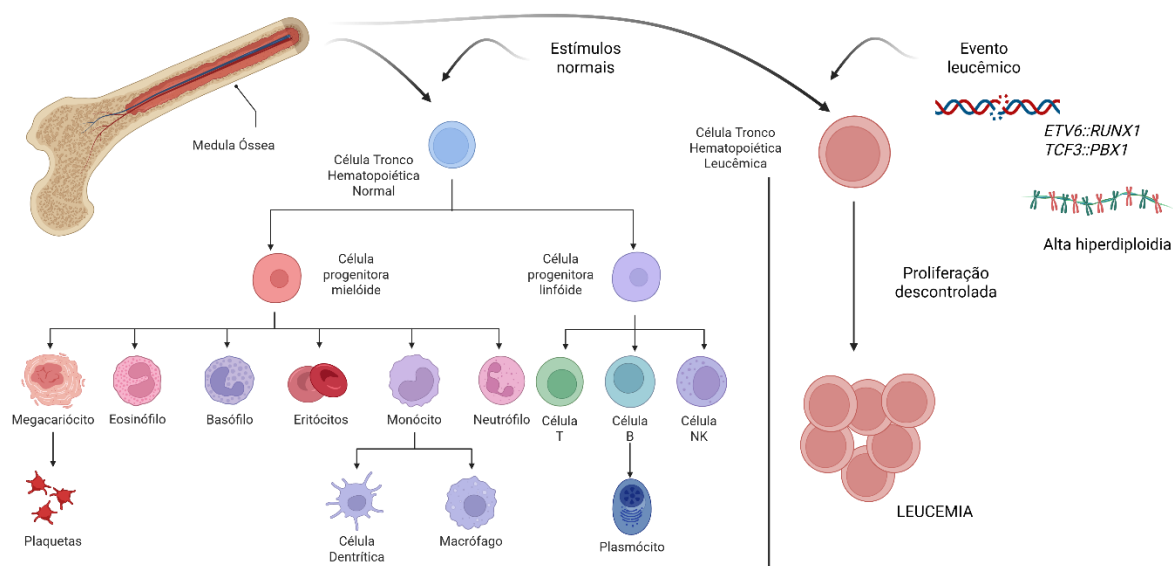


Figura 1. Hematopoiese normal e leucêmica. Criado em: <https://BioRender.com>

A identificação de fatores genéticos de prognóstico levou à adaptação de tratamentos de acordo com o risco de um desfecho desfavorável, permitindo tratamentos mais intensivos para casos de alto risco e terapias menos tóxicas para pacientes de baixo risco. Subgrupos moleculares-citogenéticos de LLA-B, como a fusão *BCR::ABL1* ou o rearranjo do gene *KMT2A*, tendem a apresentar alta contagem de leucócitos (> 50.000 céls/uL) e prognóstico desfavorável. Em contraste, subgrupos como a alta hiperdiploidia ou a fusão *ETV6::RUNX1* geralmente exibem características clínicas de baixo risco e têm boas taxas de sobrevida e remissão a longo prazo com terapias mais brandas (Maloney *et al.*, 1999; Rubnitz *et al.*, 1997; Shurtleff *et al.*, 1995; Trueworthy *et al.*, 1992).

Além das alterações genéticas, a estratificação de risco na LLA-B também leva em conta parâmetros clínicos e a resposta à quimioterapia, sendo essencial para guiar a conduta terapêutica. Os critérios mais frequentemente utilizados estão descritos na Tabela 1, incluindo idade no diagnóstico, contagem leucocitária inicial, envolvimento extramedular e avaliação da doença residual mínima ao final da fase indutória (Inaba *et al.*, 2025; Lee *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Principais critérios utilizados para estratificação de risco na leucemia linfóide aguda B (LLA-B).

Grupo de risco	Crítérios principais
Baixo risco	<ul style="list-style-type: none"> • Idade entre 1 e 10 anos; • Leucócitos $< 50 \times 10^9/L$; • Presença de <i>ETV6::RUNX1</i> ou trissomias simultâneas de 4, 10 e 17.
Alto risco (Qualquer um dos seguintes critérios, independentemente de características favoráveis)	<ul style="list-style-type: none"> • Idade ≥ 10 anos; • Leucócitos $\geq 50 \times 10^9/L$; • Comprometimento de SNC ou testicular; • Resposta insatisfatória à fase indutória; • Presença de <i>TCF3::PBX1</i> ou rearranjos de <i>KMT2A</i>; • DRM positiva ao final da indução.
Muito alto risco	<ul style="list-style-type: none"> • Idade ≥ 15 anos;

	<ul style="list-style-type: none"> • Leucócitos $\geq 100 \times 10^9/L$; • LLA Ph+; • Hipodiploidia (≤ 44 cromossomos); • LLA infantil (< 1 ano); • Falha na indução.
--	--

1.1.1 Diagnóstico e monitoramento

O diagnóstico laboratorial da LLA- B envolve uma abordagem integrada de diferentes metodologias para uma caracterização precisa da doença. Exames morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares são complementares e fundamentais para estabelecer o subtipo da leucemia, estratificar o risco e guiar decisões terapêuticas. Nos últimos anos, técnicas de alta sensibilidade e resolução, como a citometria de fluxo e o sequenciamento de RNA (RNA-seq), têm se destacado por permitir análises mais detalhadas da heterogeneidade celular, avaliação de resposta ao tratamento e das alterações moleculares presentes (Inaba e Pui, 2021).

1.1.1.1 Sequenciamento de RNA (Ácido Ribonucleico)

O sequenciamento de RNA (RNA-seq) é amplamente utilizado para medir a expressão gênica diferencial entre condições, tecidos ou estágios de desenvolvimento distintos. Essa aplicação ajuda a identificar genes que são hiperexpressos ou reprimidos em resposta a estímulos específicos ou em determinados estágios de doença. A tecnologia fornece uma visão de alta resolução do transcriptoma, superando métodos anteriores em sensibilidade e precisão. Isso é crucial para identificar vias biológicas significativas envolvidas no desenvolvimento e em doenças (Nirmal et al., 2024).

O RNA-seq tem se tornado uma ferramenta essencial no diagnóstico e prognóstico das leucemias agudas, permitindo a detecção de fusões gênicas e mutações-chave que podem passar despercebidas em métodos convencionais. Sua alta sensibilidade possibilita a análise de amostras com baixa quantidade de blastos leucêmicos, além de facilitar a descoberta de fusões raras e novas mutações, ampliando o conhecimento molecular da doença e revelando potenciais alvos terapêuticos. Além disso, a integração do RNA-seq com outros exames, como FISH e

cariótipo, aumenta a confiabilidade dos achados, reforçando sua importância na medicina personalizada e contribuindo para um tratamento mais preciso e individualizado das leucemias agudas (Chouvarine *et al.*, 2021).

Apesar de ser uma ferramenta poderosa na detecção de fusões gênicas e no mapeamento de perfis de expressão, o RNA-seq apresenta limitações importantes. Por depender da transcrição ativa, variantes presentes no DNA mas que não geram transcritos, não são detectadas. Além disso, fatores como a instabilidade do RNA, sua tendência à degradação e a ocorrência de modificações pós-transcricionais podem comprometer a representatividade dos dados gerados (Ku *et al.*, 2012).

1.1.1.2 Doença residual mínima

A avaliação da Doença Residual Mínima (DRM) surgiu como um método para detectar células leucêmicas residuais que não eram visíveis ao microscópio, proporcionando uma estratificação de risco de recidiva mais precisa do que os fatores prognósticos tradicionais (Goulden, Oakhill e Steward, 2001).

Citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase (PCR) foram os principais métodos utilizados para detecção de DRM, sendo a citometria de fluxo aplicável, representando até 90% das avaliações dos pacientes e fornecendo informações prognósticas comparáveis aos métodos baseados em PCR (Dworzak e Panzer-Grümayer, 2003).

Ao longo do tempo, a DRM tornou-se um fator prognóstico essencial na LLA, sendo incorporada aos protocolos de tratamento para orientar as decisões terapêuticas, permitindo que fossem identificados pacientes que se beneficiariam de um tratamento intensificado ou outros que poderiam receber uma terapia mais branda, podendo minimizar efeitos adversos (Contreras Yametti *et al.*, 2021; Saliba e Foà, 2023).

A integração da DRM nos protocolos de tratamento, como o ALL IC-BFM 2009, levou a altas taxas de sobrevida, com os níveis de DRM em dias específicos do tratamento sendo cruciais para a estratificação dos pacientes e a otimização da terapia (Shervashidze *et al.*, 2022).

Avanços recentes incluem novas tecnologias para avaliação de DRM, como o sequenciamento de nova geração (NGS), que oferece maior sensibilidade e a capacidade de rastrear a evolução da doença com mais precisão, embora exija bioinformática avançada e padronização. O status da DRM é agora um fator prognóstico e preditivo poderoso tanto na

LLA pediátrica quanto na adulta, influenciando decisões sobre escalonamento ou redução da terapia e o uso de novos agentes terapêuticos (Saliba e Foà, 2023).

1.2 Subgrupos moleculares de bom prognóstico

A leucemia linfóide aguda B (LLA-B) compreende um espectro heterogêneo de neoplasias agudas que afetam precursores linfóides da linhagem B. Essa heterogeneidade se reflete em diferenças marcantes no perfil genético, no comportamento clínico e na resposta ao tratamento, o que torna a classificação molecular um elemento central no manejo da doença. Com os avanços das técnicas de biologia molecular, especialmente o sequenciamento de nova geração (NGS), tornou-se possível identificar alterações genéticas recorrentes com impacto direto no diagnóstico, prognóstico e nas decisões terapêuticas.

Na mais recente classificação da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – WHO) (International Agency for Research on Cancer, 2024), os subtipos de LLA-B passaram a ser definidos por alterações recorrentes, incluindo alterações numéricas, como alta hiperdiploidia, geralmente associada a bom prognóstico. A hipodiploidia, por sua vez é classificada com desfecho desfavorável. Também são reconhecidos genes de fusão, como *ETV6::RUNX1* e *TCF3::PBX1*, relacionados a melhor resposta ao tratamento, e outros associados a risco elevado, como *KMT2A* e *TCF3::HLF*. A categoria abrange ainda casos com amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (iAMP21), subgrupos “like” (*BCR::ABL1*-like, *ETV6::RUNX1*-like), e um conjunto crescente de alterações definidas, incluindo rearranjos em *DUX4*, *MEF2D*, *ZNF384*, *NUTM1*, *MYC*, e mutações em *PAX5*, como *PAX5* p.P80R e o grupo *PAX5alt*. Casos sem alteração recorrente identificável permanecem classificados como LLA-B não especificada (NOS).

Apesar dos excelentes resultados em alguns subgrupos moleculares considerados de baixo risco, há uma preocupação crescente devido às altas taxas de recaída a longo prazo. Diversos estudos relatam recaídas em casos com essas alterações, questionando a significância prognóstica dessas mutações (Asai *et al.*, 2014; Ford *et al.*, 2001; Jeha *et al.*, 2009; Malinowska-Ozdowy *et al.*, 2015; Mehtonen *et al.*, 2020).

1.2.1 Fusão *ETV6::RUNX1*

A fusão *ETV6::RUNX1*, anteriormente chamada *TEL::AML1*, resultante da t(12;21) (p12;q22), é a translocação mais comum em LLA pediátrica, presente em aproximadamente

20-25% dos casos de LLA-B. Pacientes com essa translocação geralmente apresentam uma taxa de sobrevida livre de doença em cinco anos de 80 a 97%, indicando um ótimo prognóstico. No entanto, estudos indicam uma taxa de recaída significativa (20 a 24%) nos pacientes com essa fusão, sugerindo dúvidas sobre seu valor prognóstico (Ford et al., 2001).

Os mecanismos decorrentes da fusão *ETV6::RUNXI* envolvidos no processo de transformação da doença incluem: repressão transcricional, interação com proteínas ligantes de RNA e ativação de vias de sinalização oncogênicas. A indução do perfil de repressão transcricional pela fusão é mediada por interações com histonas que são associadas à quiescência e redução e atividade de transcrição, resultando no estado pré-leucêmico silencioso (Jepsen et al., 2025).

No caso das proteínas ligantes de RNA, algumas, podem estar hiperexpressas nas leucemias positivas para *ETV6::RUNXI*, potencializando a sinalização oncogênica, formando um ciclo de retroalimentação positiva e desregulando vias cruciais para a prevalência dos clones leucêmicos (Sharma et al., 2023).

Apesar da alta prevalência da fusão *ETV6::RUNXI* na LLA-B pediátrica, a fusão é encontrada em cerca de 5% do recém-nascidos e, por si só, não é responsável por causar a leucemia, sendo necessário um segundo evento, como variantes em *PAX5* e *CDKN2A/B* para completar a transformação leucêmica de células B. O tipo dessas mutações influencia a identidade da leucemia, destacando a importância das alterações genéticas iniciais nas células precursoras hematopoiéticas (Alpar et al., 2015; Rahnemoon, 2021; Rodríguez-Hernández et al., 2017; Zapilko et al., 2023).

Embora já esteja muito bem estabelecido que a fusão *ETV6::RUNXI* seja crucial para a leucemogênese, seu papel na manutenção da leucemia ainda é debatido, com alguns estudos sugerindo que a fusão é essencial, enquanto outros apontam para a necessidade de mudanças genéticas adicionais para sustentar o estado leucêmico (Montaño et al., 2019, 2020)

As recaídas associadas à t(12;21) tendem a ocorrer após o fim do tratamento, o que sugere uma resistência terapêutica dependente do protocolo utilizado (Ford et al., 2001).

1.2.2 Fusão *TCF3::PBX1*

A t(1;19)(q23;p13) e sua variante desbalanceada der(19)t(1;19)(q23;p13) são anomalias cromossômicas reconhecidas na LLA-B pediátrica (Moorman et al., 2010; Pui, Robison e Look, 2008), resultando na fusão *TCF3::PBX1* (Mellentin et al., 1989).

O Fator de Transcrição 3 (*TCF3*, também chamado de *E2A*) codifica outros dois fatores de transcrição, E12 e E47, enquanto o *Pre-B-Cell Leukemia Homeobox 1 (PBX1)* codifica uma proteína da família dos homeodomínios. Ambos são essenciais para o desenvolvimento linfoide. A proteína de fusão *TCF3::PBX1* (E2A-PBX1), composta pelos domínios de ativação do *TCF3* e um domínio de ligação ao DNA do *PBX1*, provavelmente interfere na diferenciação hematopoiética ao desregular a expressão dos genes homeobox (*HOX*) e os alvos do fator de transcrição *TCF3* (Ghazavi *et al.*, 2015).

Embora inicialmente associada a um prognóstico ruim, essa translocação ocorre em cerca de 5-6% dos casos de LLA-B pediátrica e com os avanços em protocolos terapêuticos, a sobrevida livre de doença desses casos aumentou consideravelmente, se aproximando à de outros subtipos de bom prognóstico (Pang *et al.*, 2015). Ainda assim, 10% dos pacientes com t(1;19) apresentam recaída, muitas vezes com prognóstico desfavorável e maior incidência de infiltração no sistema nervoso central (SNC) em comparação com outros subgrupos (Jeha *et al.*, 2009).

Segundo o protocolo de tratamento mais recente (2021) proposto pelo Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda (GBTLI), essa alteração voltou a ser enquadrada como uma alteração que caracteriza a LLA como de alto risco, mas foi incluído no estudo por ter apresentado, ao longo dos anos, variações na estratificação de risco, de intermediário a alto risco, e por ter alcançado elevadas taxas de sobrevida com a intensificação dos protocolos terapêuticos.

1.2.3 Alta hiperdiploidia

A hiperdiploidia (HD) foi descrita pela primeira vez por Fritz Lampert em 1967, quando ele mediu o conteúdo de DNA das células leucêmicas comparando meticolosamente seus diâmetros com os dos linfócitos normais. Apesar dos métodos citogenéticos rudimentares disponíveis na época, ele conseguiu definir com bastante precisão a natureza dos cromossomos adquiridos e percebeu que os pacientes afetados viviam mais do que os outros (Haas e Borkhardt, 2022).

A alta hiperdiploidia (50 a 67 cromossomos) é a maior entidade genética da LLA, abrangendo cerca de 30% dos casos de LLA-B pediátrica (Malinowska-Ozdowy *et al.*, 2015; Paulsson *et al.*, 2015).

Apesar de muitos avanços nos estudos sobre as aneuploidias relacionados à LLA-B, muitas questões fundamentais permanecem sem resposta. Essas questões envolvem principalmente suas origens, as causas e o significado biológico das diferentes configurações cromossômicas não aleatórias e inerentes à doença, além do seu desenvolvimento variado e comportamento clínico (Haas e Borkhardt, 2022).

Pesquisas indicam que trissomias específicas, como as dos cromossomos 4 e 10, estão associadas a melhor prognóstico (Harris et al., 1992; Heerema et al., 2000), enquanto células leucêmicas hipodiploides podem dobrar seu conteúdo cromossômico, levando a um diagnóstico falso de hiperdiploidia (Carroll *et al.*, 2019).

Há algum tempo, estudos buscam identificar subgrupos com risco muito baixo de recaída para considerar a redução do tratamento, mas faltam validações robustas e não há um consenso sobre a definição de alta hiperdiploidia de baixo risco. Estudos recentes, como o de Enshaei et al., 2021, demonstram que o padrão de trissomias presentes pode influenciar significativamente o prognóstico.

O subgrupo de pacientes classificados como de baixo risco inclui aqueles que apresentam os cariótipos com trissomia do cromossomo 17 e/ou 18, desde que não haja a presença simultânea de trissomias do cromossomo 5 ou 20. Quando essas últimas estão presentes em combinação com +17 ou +18, o perfil prognóstico tende a ser menos favorável (Lee, Ashcraft, *et al.*, 2023). Além disso, evidências de outros estudos apontam que a presença isolada de +6, a associação de +4 e +10, ou a trissomia simultânea de +4, +10 e +17 também estão relacionadas a desfechos clínicos mais positivos. No entanto, apesar desses achados, ainda não há consenso definitivo sobre qual combinação cromossômica representa o melhor prognóstico, e os critérios utilizados para definir os grupos de baixo risco variam entre os diferentes estudos (Ramos-Muntada *et al.*, 2022)

Embora apenas uma pequena proporção da principal variante hiperdiploide (HD) apresente recidivas, essa forma ainda corresponde a 25% de todas as recidivas que ocorrem na LLA-B infantil. Atualmente, os processos que impulsionam essas recidivas, que ocorrem predominantemente em estágios tardios da doença, ainda são pouco compreendidos (Haas e Borkhardt, 2022).

1.3 Microambiente tumoral

Além das características genéticas das células tumorais, o microambiente circundante exerce um papel crucial na resistência às terapias (Simioni *et al.*, 2021). A hipótese do "solo fértil", que sugere a necessidade de um ambiente favorável para o desenvolvimento do câncer, tem sido alvo de investigações (Akhtar *et al.*, 2019). Estudos mostram que o microambiente tumoral, especialmente as células estromais, desempenha um papel fundamental na progressão tumoral (Fidler, 2002).

A resistência e a subsequente recidiva associadas à quimioterapia padrão, terapias direcionadas e abordagens imunoterapêuticas, permanecem uma das principais causas de morte relacionada ao câncer pediátrico. Estudos caracterizaram vias subjacentes que podem justificar a falha do tratamento, analisando pares de diagnóstico/recidiva, levando à descoberta de alterações genéticas e epigenéticas intrínsecas à leucemia associadas à resistência a medicamentos e a um modelo de evolução clonal baseado na heterogeneidade tumoral. Uma abordagem para superar a heterogeneidade tumoral e a resistência à terapia imunológica é avaliar o papel do microambiente da medula óssea na promoção e no suporte à sobrevivência e progressão da leucemia (Figura 2) (Witkowski *et al.*, 2020).

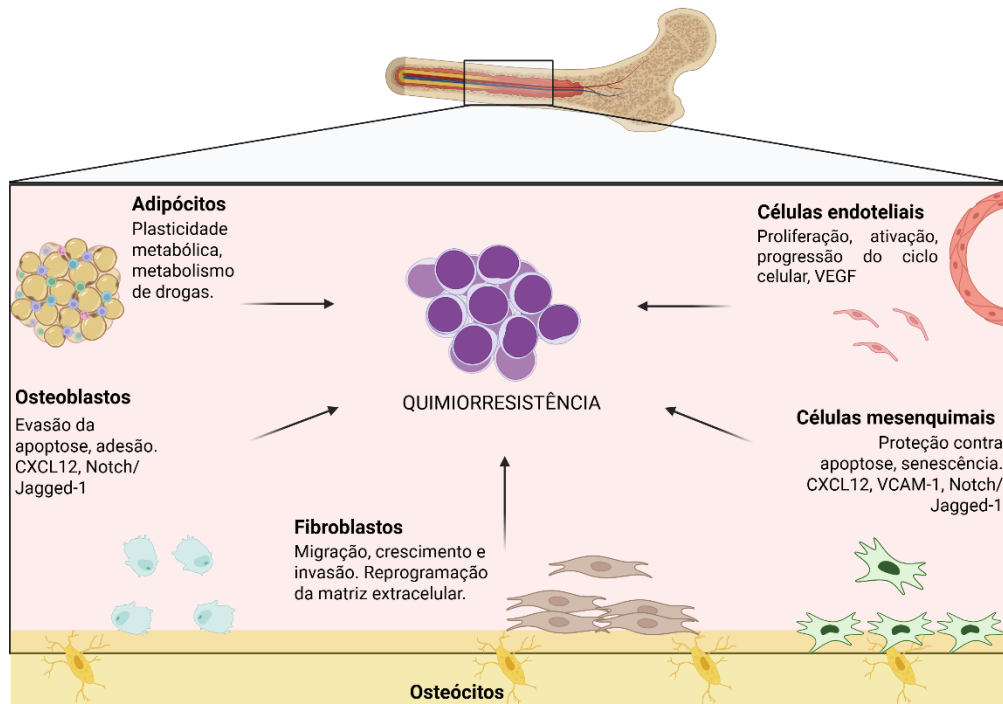


Figura 2. Microambiente medular em contexto leucêmico e papel dos adipócitos, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e mesenquimais na manutenção das células leucêmicas. Adaptado de: Panting, Kotecha e Cheung, (2024). Criado em: <https://BioRender.com>

É sabido que tumores possuem uma pequena subpopulação de células responsáveis por iniciar o câncer e causar recidivas. As células-tronco leucêmicas (LSC), assim como as células-tronco hematopoiéticas normais (HSC), dependem da interação com o microambiente (nicho medular) para garantir sua autorrenovação e manutenção (Ebben *et al.*, 2010).

Esse microambiente é composto não apenas por células tumorais, mas também por tecidos normais, incluindo o estroma, estrutura de suporte composta por fibroblastos, vasos sanguíneos e leucócitos, como linfócitos T e macrófagos. Além disso, células do sistema imunológico inato, como macrófagos, granulócitos e células mieloides imaturas, das quais derivam monócitos ou macrófagos, também estão presentes em diferentes proporções (Simioni *et al.*, 2021).

Atualmente, tem-se compreendido cada vez mais que o sistema imunológico pode desempenhar um papel duplo no desenvolvimento do câncer, atuando tanto de forma antitumoral quanto contribuindo para a progressão do tumor. Essa atuação paradoxal do sistema imunológico pode resultar em quimiorresistência e limitar a eficácia dos tratamentos disponíveis, é explicada pela sua plasticidade, capaz de conferir propriedades pró ou antitumorais a depender dos estímulos (Kulkarni *et al.*, 2019).

As pesquisas sobre malignidades hematológicas têm como principal objetivo desenvolver novas terapias direcionadas à medula óssea e seus nichos, integradas a protocolos otimizados. Essas abordagens visam inibir interações entre células malignas e redes celulares hematopoiéticas intrínsecas, além de regular interleucinas essenciais para a funcionalidade do nicho medular (Simioni *et al.*, 2021).

Um dos principais fatores moduladores do microambiente tumoral é a hipóxia, que impulsiona a formação de novos vasos sanguíneos, essenciais para o crescimento, progressão e manutenção das células leucêmicas. A caracterização completa desse microambiente ainda é um desafio. A descoberta contínua das interações entre a leucemia linfóide aguda (LLA) e seu microambiente tem gerado avanços clínicos significativos, demandando estratégias abrangentes para o estudo da leucemogênese. Tecnologias como proteômica, genômica, imageamento avançado e sequenciamento, aliadas a novas abordagens imunoterapêuticas, são fundamentais para expandir as possibilidades terapêuticas e melhorar as taxas de cura tanto em pacientes pediátricos quanto adultos (Simioni *et al.*, 2021).

1.3.1 Células estromais

Nesse contexto, as células estromais da medula óssea, incluindo osteoblastos, células endoteliais e células-tronco mesenquimais (MSCs), desempenham um papel essencial no microambiente hematopoiético, regulando processos como a renovação e a quiescência das células-tronco hematopoéticas (HSCs). Em leucemias, as células malignas modulam esse microambiente para favorecer sua sobrevivência, promovendo interações que influenciam reciprocamente seu comportamento biológico (Ayob e Ramasamy, 2018; Ebben *et al.*, 2010; Schepers, Campbell e Passegué, 2015; Simioni *et al.*, 2021; Walcher *et al.*, 2020).

Compreender essas interações é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Estudos recentes destacam as células estromais da medula óssea como potenciais alvos terapêuticos, incluindo sua avaliação combinada com a detecção de DRM e células endoteliais para uma melhor estratificação de risco na LLA-B (Oliveira *et al.*, 2022; Simioni *et al.*, 2021).

As células endoteliais do microambiente da medula óssea desempenham um papel ativo na fisiopatologia da LLA-B. Além de fornecerem suporte estrutural e fatores tróficos para as células hematopoiéticas normais, essas células também podem favorecer a sobrevivência e a proliferação de blastos leucêmicos por meio da liberação de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Evidências sugerem que a interação entre células leucêmicas e o endotélio contribui para a evasão imune, resistência terapêutica e manutenção de nichos protetores que podem dificultar a erradicação completa da doença (Delahaye *et al.*, 2021).

Além disso, as MSCs, em particular, desempenham um papel central na manutenção do nicho das HSCs, tanto por meio da secreção de citocinas quanto por interações célula a célula e possuem efeitos imunomodulatórios específicos sobre diversas células da resposta imune, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, por mecanismos ainda não completamente elucidados (Conforti *et al.*, 2013).

Em conjunto, células endoteliais e mesenquimais contribuem para um microambiente permissivo à leucemia, favorecendo a sobrevivência e resistência das células malignas. Estudos recentes sugerem que um desequilíbrio na proporção entre essas populações, com aumento relativo de células endoteliais durante o tratamento, pode estar associado a piores desfechos clínicos, independentemente do status de DRM, reforçando a importância do microambiente da medula óssea na manutenção e no prognóstico da LLA-B (Fallati *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2022).

2 Justificativa

Desvendar critérios genéticos e moleculares que possibilitem uma melhor estratificação de risco nas leucemias pediátricas, especialmente naquelas classificadas pelos protocolos atuais como de baixo ou intermediário risco, continua sendo um grande desafio. Apesar de apresentarem menor probabilidade de recaídas, muitos desses casos resultam em desfechos clínicos desfavoráveis. Como forma de contribuir no entendimento dos eventos biológicos que justificam o problema acima mencionado, este projeto propõe buscar novos marcadores moleculares a partir de uma análise multifatorial ou colaborativa das lesões e seus efeitos associativos, além de investigar do componente estromal do microambiente tumoral, buscando fatores que são cruciais para esclarecer os mecanismos de recaídas e, conseqüentemente, para aprimorar o sucesso terapêutico. Ao aplicar os princípios da medicina de precisão, fundamentada nos achados moleculares, o projeto tem o potencial de aprimorar a terapia do câncer pediátrico, refinando os critérios atuais de estratificação de risco e permitindo o desenvolvimento de protocolos de tratamento mais eficazes. A longo prazo, espera-se, com isso, reduzir ainda mais as taxas de recaídas, o tempo de hospitalização, além de melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida dos pacientes.

3 Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Investigar as interações entre o microambiente tumoral da medula óssea e o perfil molecular de pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda B de bom prognóstico, buscando identificar alterações ou fatores associados à ocorrência de recaídas.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever características epidemiológicas, clínicas e biológicas dos pacientes com diagnóstico de LLA-B com estratificação de bom prognóstico em remissão ou que apresentaram recaída no Hospital da Criança de Brasília;
- Analisar lesões moleculares de pacientes com LLA-B classificadas como de bom prognóstico;
- Descrever o perfil das células estromais (mesenquimais e endoteliais) da medula óssea de pacientes com LLA-B por citometria de fluxo nas amostras de diagnóstico e seguimento;
- Verificar co-ocorrência de lesões moleculares e/ou alterações no compartimento de células estromais (mesenquimais e endoteliais) na medula óssea de pacientes com LLA-B de bom prognóstico que apresentaram recaída;
- Identificar novos biomarcadores de prognóstico para estratificação de risco de pacientes de LLA-B.

4 Metodologia

Trata-se de um estudo transversal descritivo retrospectivo. Foram avaliadas amostras que receberam o diagnóstico pelo Laboratório de Pesquisa Translacional (LPT) no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2022. Todos os experimentos do estudo foram realizados no Laboratório de Pesquisa Translacional, no Hospital da Criança de Brasília.

4.1 Critérios de inclusão

Pacientes entre 0 e 18 anos com primeiro diagnóstico de LLA-B apresentando *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1* ou alta hiperdiploidia (50 a 67 cromossomos), no período de

janeiro de 2012 a dezembro de 2022, submetidos ao protocolo terapêutico adequado à sua estratificação.

4.2 Critérios de exclusão

Pacientes com recaídas/refratários por motivos de não adesão ao tratamento ou com tratamento prévio em outra instituição.

4.3 Tecnologias disponíveis

Entre 2012 e 2022, o Laboratório de Pesquisa Translacional (LPT) passou por importantes avanços tecnológicos, que impactaram a condução dos estudos. A partir de 2012, estavam disponíveis a RT-PCR convencional para identificação de fusões gênicas recorrentes e o mielograma para avaliação da doença residual mínima (DRM). Na época, a imunofenotipagem e o cariótipo eram terceirizados em laboratórios de apoio, o que frequentemente comprometia a viabilidade das amostras e dificultou a obtenção de resultados completos.

No final de 2017, a aquisição de um citômetro de fluxo possibilitou a realização da imunofenotipagem e da avaliação da doença residual mínima (DRM) de forma mais sensível e precisa. Já no início de 2020, foi implementado o painel de DRM para LLA-B desenvolvido pelo grupo EuroFlow, o que aprimorou ainda mais a sensibilidade das análises e permitiu, adicionalmente, a avaliação do compartimento de células estromais na medula óssea. No mesmo ano, a criação do setor de citogenética viabilizou a realização de cariótipos por banda G no próprio laboratório, promovendo maior integração entre as análises moleculares, imunofenotípicas e citogenéticas, além de aumentar a eficiência diagnóstica. Por fim, em abril de 2024, a chegada do equipamento de sequenciamento de nova geração (NGS) ampliou a capacidade de investigação das leucemias, permitindo uma análise mais aprofundada das alterações moleculares e dos níveis de expressão gênica.

Além da modernização dos exames, em 2019 houve a substituição do sistema de prontuário eletrônico. Embora a atualização tenha melhorado a gestão dos dados clínicos, ela impactou na perda de informações anteriores, impactando o acesso aos registros completos de pacientes diagnosticados antes da mudança.

A Figura 3 apresenta uma linha do tempo dos métodos de avaliação da resposta ao tratamento e dos protocolos terapêuticos utilizados entre 2012 e 2022 (A), período

correspondente ao recorte temporal deste estudo. Até o ano de 2018, a resposta foi monitorada exclusivamente por meio de mielograma. A partir de 2018, foi instituída a detecção de doença residual mínima (DRM) por citometria de fluxo, e, no final de 2019, foram implementados os painéis do consórcio EuroFlow, permitindo também a análise de células estromais na amostra de medula óssea.

Quanto aos protocolos de tratamento utilizados, pacientes diagnosticados até maio de 2015 foram tratados segundo o protocolo GBTLI93. Entre maio de 2015 e julho de 2019, foram utilizados os protocolos BFM95 e GBTLI99. O protocolo BFM permaneceu em uso até agosto de 2022, sendo então substituído, a partir de setembro de 2022, pela versão atualizada GBTLI2021.

A parte B da figura ilustra a distribuição das amostras submetidas às análises moleculares, destacando o número de amostras disponíveis e com qualidade suficiente para serem avaliadas pelas metodologias em cada momento (diagnóstico e recaída) e a quantidade de pacientes que tiveram amostras utilizadas para avaliação do microambiente medular na leucemia. A figura evidencia as limitações temporais decorrentes do caráter retrospectivo do estudo.

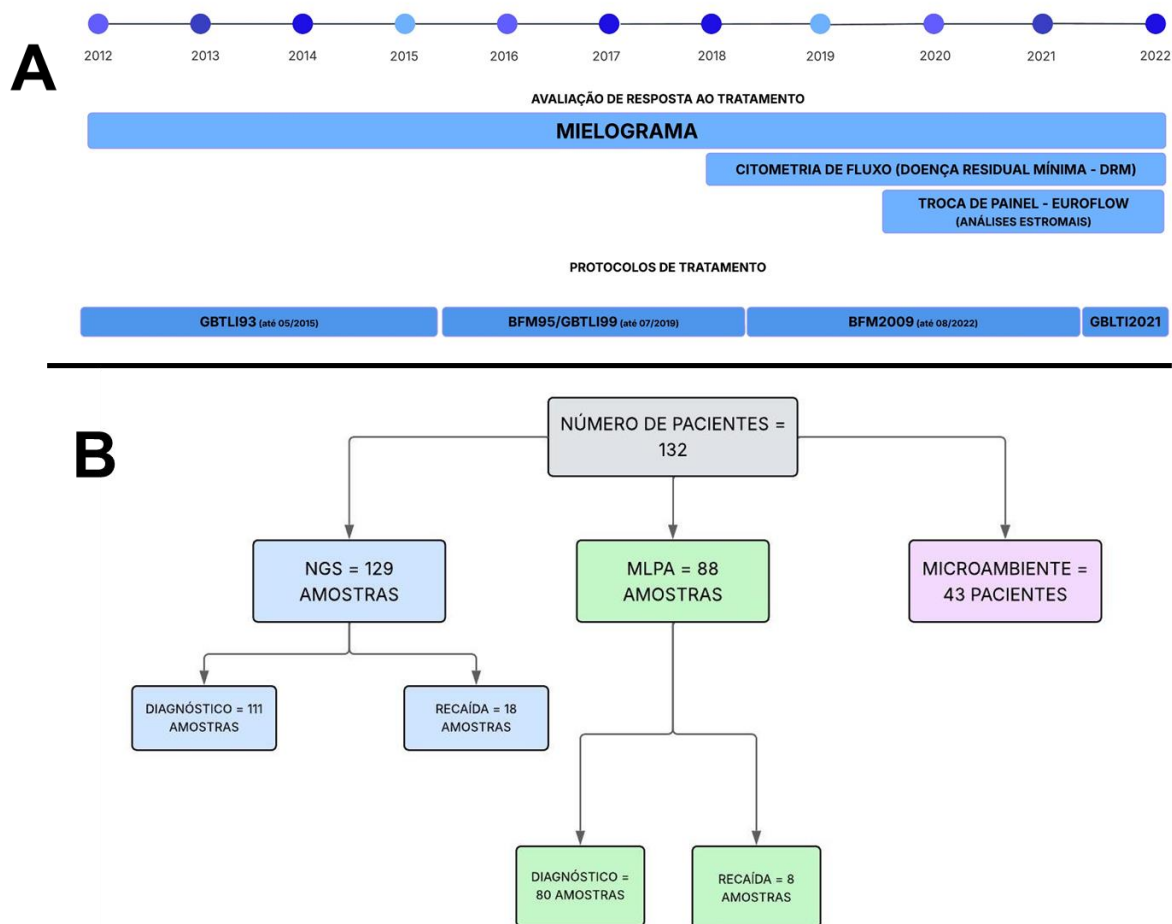


Figura 3. (A) Linha do tempo dos métodos de avaliação da resposta terapêutica e dos protocolos de tratamento utilizados no Hospital da Criança de Brasília (HCB) entre 2012 e 2022. Até 2018, a resposta foi avaliada exclusivamente por mielograma, com introdução da detecção de doença residual mínima (DRM) por citometria de fluxo a partir de 2018 e implementação dos painéis EuroFlow em 2019. Os protocolos terapêuticos utilizados variaram ao longo do período: GBTLI93 até maio de 2015, BFM95 e GBTLI99 entre 2015 e 2019, BFM até agosto de 2022 e GBTLI2021 a partir de setembro de 2022. (B) Distribuição das amostras incluídas nas análises moleculares, indicando o número de amostras de diagnóstico e de recaída submetidas ao sequenciamento de nova geração (NGS) e à *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), bem como aquelas utilizadas para avaliação do microambiente medular.

4.4 Fluxograma de testagem para diagnóstico das LLA-B

Para serem incluídas no projeto, as amostras com presença de células imaturas seguiram para a análise imunofenotípica onde foram marcadas com uma combinação de anticorpos específicos para a triagem e classificação da linhagem de células B no momento do diagnóstico. Uma vez confirmado o diagnóstico ou recaída, as amostras seguiram para a avaliação das

alterações genéticas e classificação diagnóstica pelas técnicas de citogenética e biologia molecular (RT-PCR e MLPA). As amostras de pacientes diagnosticados com LLA-B com a presença dos rearranjos gênicos recorrentes - *ETV6::RUNX1* ou *TCF3::PBX1* – ou que apresentaram alta hiperdiploidia na avaliação por bandeamento G, foram avaliadas quanto ao seu perfil de células estromais no microambiente tumoral, nos arquivos de citometria de fluxo nos pontos monitoramento da DRM e foram incluídas para testagem por NGS (Figura 5).

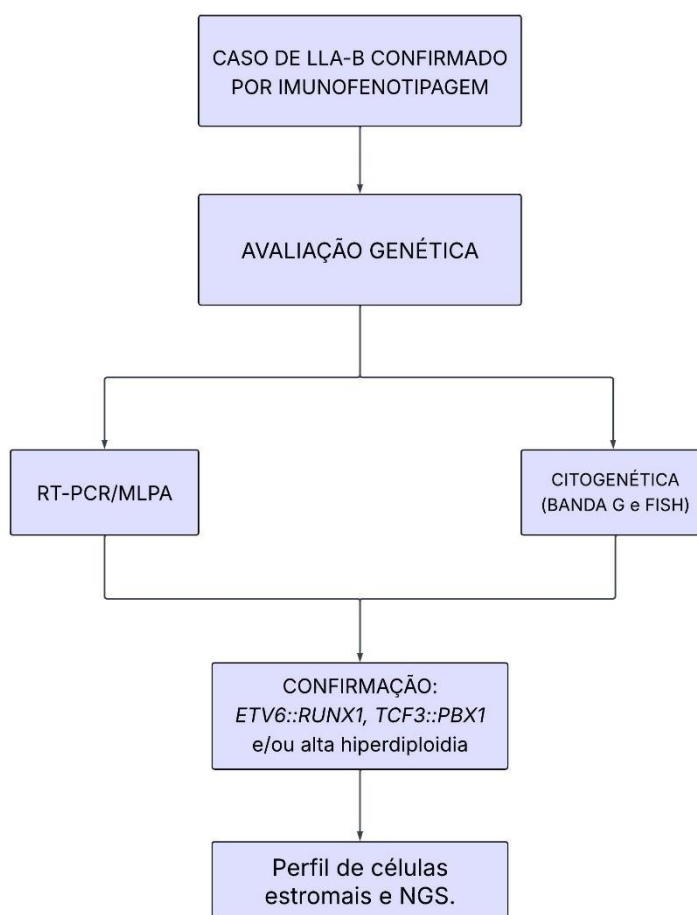


Figura 4. Fluxograma das etapas de triagem, confirmação diagnóstica e encaminhamento das amostras para análises complementares, incluindo as análises do perfil das células estromais no microambiente medular e o sequenciamento de nova geração.

4.5 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do Hospital da Criança de Brasília em 20 de julho de 2023, CAAE 67108523.9.0000.0144

4.5.1 Consentimento informado

Com base nos dados do Registro Hospitalar de Câncer do Hospital da Criança de Brasília, os pacientes elegíveis foram recrutados durante consultas médicas presenciais ou por meio de contato remoto, via ligações telefônicas ou videoconferência. As informações de contato utilizadas para chamadas telefônicas foram obtidas a partir do prontuário eletrônico, incluindo telefone, e-mail e endereço.

Os termos de consentimento e assentimento, para pacientes com mais de 6 anos, foram aplicados por um profissional capacitado, que esclareceu os detalhes do estudo. A assinatura foi realizada de forma digital por meio do software REDCap.

Para os participantes falecidos, considerando que o vínculo dos familiares com a instituição já havia sido encerrado e que a solicitação de participação na pesquisa poderia causar impacto emocional significativo e para pacientes que não realizam mais acompanhamento no HCB e cujos dados de contato estavam desatualizados, inviabilizando a comunicação com seus familiares, foi concedida a dispensa dos TCLE e TALE pelo CEP competente.

4.5.2 Manutenção do sigilo

Para garantia da preservação do sigilo de todas as informações pessoais, dados clínicos e achados laboratoriais foram anonimizados, os pacientes foram identificados pelo número de registro no laboratório de pesquisa translacional e pelo número de identificação do paciente na ferramenta de coleta de dados (*software* RED Cap).

4.6 Amostras

Para os estudos moleculares foram utilizadas amostras de aspirado de medula óssea e/ou sangue periférico no momento do diagnóstico e nas recaídas. Para os estudos de microambiente tumoral foram utilizados arquivos de citometria de fluxo nos momentos específicos de avaliação da DRM durante a terapia, preconizados pelo protocolo de tratamento.

4.7 Diagnóstico da LLA B

O diagnóstico de LLA B foi realizado através da avaliação morfológica de MO por microscopia convencional em esfregaços sanguíneos e da realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Para a caracterização inicial da leucemia, foi realizada a pesquisa de rearranjos recorrentes por RT-PCR e cariótipo por citogenética convencional. A avaliação da

disseminação extramedular foi realizada através da avaliação do líquido céfalo raquidiano (LCR) e do exame clínico dos testículos, para pacientes do sexo masculino.

4.8 Coleta de material, isolamento de mononucleares e extração de ácidos nucleicos

As amostras de medula óssea para confirmação do diagnóstico de LLA foram coletadas através de punção aspirativa com agulha específica para aspiração de medula óssea. Imediatamente após a coleta, foram realizados esfregaços para avaliação morfológica e as amostras de aspirado de medula óssea (sangue periférico, em situações de elevada leucometria e gravidade do paciente) foram encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa Translacional do HCB para a realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo, citogenética e para a pesquisa de translocações recorrentes por RT-PCR. Os remanescentes das amostras foram utilizados para as análises propostas neste projeto. Portanto, não foi necessários que os pacientes fossem submetidos a procedimentos de coletas adicionais aos previstos pela rotina necessária para diagnóstico e direcionamento de tratamento.

4.9 Análise morfológica de MO

A avaliação morfológica através de microscopia óptica de amostras de medula óssea foi realizada por profissional médico hematologista em esfregaços de medula óssea (ou sangue periférico em casos de alta gravidade do paciente) corados com hematoxilina eosina. O diagnóstico de Leucemia Aguda foi estabelecido quando identificadas 20% ou mais células blásticas no esfregaço.

Embora as características morfológicas possam sugerir a origem do clone leucêmico, a definição de linhagem leucêmica foi realizada apenas através de imunofenotipagem por citometria de fluxo.

4.10 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem por citometria de fluxo foi realizada em amostras de MO ou de sangue periférico (em casos de alto leucometria e gravidade clínica) para a confirmação do diagnóstico de LLA e para a aferição de DRM conforme o preconizado pelo protocolo de tratamento. A imunofenotipagem foi realizada com citômetro de 8 cores e os eventos celulares foram adquiridos através do citômetro FACS Canto II (BD). A análise dos dados foi realizada

com a utilização dos softwares FACS Diva (BD) e Infinicyt (Cytognos versão 2.0) (Van Dogen *et al.*, 2012).

As amostras de MO ou SP de pacientes com suspeita de Leucemia Aguda foram analisadas inicialmente por um painel de triagem, que distingue a linhagem da célula neoplásica (mieloide, linfóide B ou linfóide T). De acordo com a linhagem identificada pelo painel inicial, o amostra foi submetida a análise subsequente, com painel ampliado e específico, para melhor caracterização do clone leucêmico (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Painel de anticorpos para triagem de leucemias agudas (08 marcadores).

Fluoro- cromo	FITC	PE	PERCP CY5.5	PE CY7	APC	A. FLUOR 750	PACIFIC BLUE	P. ORANGE
Tubo 1	CD3	MPO	CD34	CD117	CD79a	CD19	CD3	CD45

Tabela 3. Painel de anticorpos para o diagnóstico de LLA B (25 marcadores).

Fluoro- cromo	FITC	PE	PERCP CY5.5	PE CY7	APC	A. FLUOR 750	PACIFIC BLUE	P. ORANGE
Tubo 1	CD81	CD66c	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45
Tubo 2	CD36	NG2	CD34	CD19	CRLF2	CD38	CD20	CD45
Tubo 3	IgM*	CD22	CD34	CD19	IgM	CD2	CD33 BV421	CD45

4.10.1 Monitoramento de DRM e avaliação do microambiente tumoral das LLA-B por citometria de fluxo

Após o fechamento do diagnóstico, as amostras de medula óssea desses pacientes com LLA-B são avaliadas, em momentos específicos, para detecção de células residuais após terapia. Os pontos de avaliação de DRM são preconizados pelo protocolo de tratamento. Após marcação com a combinação de anticorpos, as suspensões de células foram adquiridas no citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Bioscience®, São José, CA). A DRM negativa foi definida com base no limite de detecção de <0,0002% de células B precursoras imunofenotipicamente aberrantes, enquanto DRM positiva indica a presença de células clonais na medula acima dos pontos de corte de cada ponto de avaliação (D15 0,01%; D33 0,001%; D78 – qualquer quantificação acima do limite de quantificação (%)).

A combinação de anticorpos (Tabela 4) presentes no painel de DRM de LLA-B permite também a identificação/caracterização *ex-vivo* de populações celulares não hematopoiéticas minoritárias na medula óssea, como as células estromais (mesenquimais e endoteliais). Para análise da distribuição relativa, as células estromais foram analisadas dentro da porcentagem de todas as células nucleadas da medula óssea, bem como a distribuição relativa dentro do compartimento de estromais (Oliveira *et al.*, 2022). Dentro do compartimento das células estromais, analisou-se a porcentagem de células endoteliais, identificadas como CD81⁺, CD73⁺, CD45⁻, CD38⁻, CD34⁺ e CD10⁺, e das células mesenquimais, identificadas como CD81⁺, CD73⁺, CD45⁺, CD19⁻, CD38⁻, CD34⁻ e CD10⁺.

Para acompanhar o perfil de distribuição das células estromais de acordo com o *status* da DRM, cada ponto de avaliação do tratamento foi dividido em dois grupos, de acordo com a presença ou ausência de DRM e analisadas com o intuito de tentar estabelecer alguma correlação entre a frequência de células estromais com a frequência de células clonais remanescentes ao tratamento. O *software Infinicyt* (Cytognos, versão 2.0) foi usado para análise de dados obtidos. Para a análise foram excluídos *debris* e *doublets*, levando em consideração apenas os eventos viáveis para o cálculo de frequência das populações de interesse. O painel de 8 cores que permite a análise e descrição do perfil de células estromais (mesenquimais e endoteliais) foi implantado a partir de 2020, com isso, para os pacientes de 2012 a 2019, foram avaliados apenas quanto ao *status* de DRM.

Tabela 4. Painel de anticorpos para a detecção de DRM em pacientes com LLA B (18 marcadores).

Fluoro-cromo	FITC	PE	PERCP CY5.5	PE CY7	APC	A. FLUOR 750	PACIFIC BLUE	P. ORANGE
Tubo 1	CD81	CD66c + CD123	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45
Tubo 2	CD81	CD304 + CD73	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45

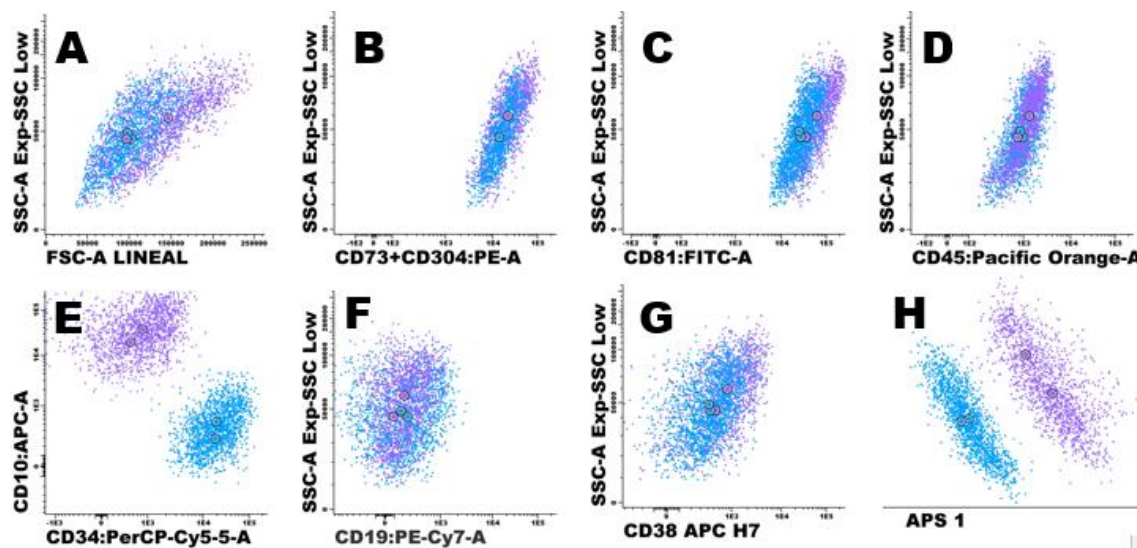


Figura 5. Os painéis A–H ilustram como as células estromais da medula óssea (EC – pontos azuis e MSC – pontos lilás) foram especificamente identificadas e classificadas após coloração com o painel de anticorpos EuroFlow BCP-ALL MRD.

4.11 Estudos genéticos-moleculares

4.11.1 Isolamento de mononucleares e extração de ácidos nucleicos

Após a confirmação do diagnóstico de leucemia por imunofenotipagem, a amostra de medula óssea foi utilizada para o isolamento das células mononucleares sanguíneas em gradiente de Ficoll (Ge Healthcare Life Sciences) lavadas em PBS 1X e aliqüotadas em dois tubos: um para extração de RNA total pelo método do Trizol® (Invitrogen), destinado à pesquisa de translocações e análise de expressão gênica, e um segundo para extração de DNA, destinado às análises de sequenciamento de Sanger e análises de fragmentos.

O DNA das amostras foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), conforme as instruções dos fabricantes. Após a extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e posteriormente acondicionadas a -30°C (amostras de DNA) e -80°C (amostras de RNA) até a realização dos ensaios.

4.11.2 Pesquisa de rearranjos recorrentes nas LLA-B por RT-PCR

A detecção de rearranjos gênicos recorrente nas amostras de pacientes com LLA-B foi realizada por RT-PCR (reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa), utilizando kit TaqPlatinum (Life Technologies). Foram utilizados primers específicos para os híbridos *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, *KMT2A::AF4*, *BCR::ABL1* p190 e *BCR::ABL1*p210. Os testes

incluiram, ainda, um controle interno por paciente, utilizando o gene da beta-microglobulina ($\beta 2M$) para verificar a qualidade da amostra, além de brancos para cada par de primers.

4.11.3 Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)

DNA genômico foi extraído e purificado por kit comercial, segundo recomendação do fabricante, e em seguida, destinado às análises de MLPA (*Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*) para detecção de alterações em genes e locus envolvidos na leucemogênese, que incluem *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6*, *RBI*, *BTG1*, *EBF1*, *CDKN2A-CDKN2B* e *CRLF2*. Os ensaios foram realizados com os kits SALSA MLPA *probemix* P335-B2 ALL-*IKZF1* e P327 iAMP21-*ERG* (MRC-Holland), seguindo as recomendações do fabricante, que inclui desnaturação do DNA, hibridização com sondas específicas, ligação enzimática, PCR multiplex e separação dos fragmentos por eletroforese capilar (ABI3500). A análise dos dados foi conduzida no software Coffalyser.Net v.240129.1959 (MRC-Holland), considerando razões de pico inferiores a 0,75 como indicativas de deleção e superiores a 1,50 como indicativas de duplicação. Para a interpretação das alterações como eventos clonais, considerou-se a proporção de blastos nas amostras, já que a MRC Holland recomenda ao menos 70% de células-alvo para uma detecção confiável. A grande maioria das amostras analisadas apresentava percentual de blastos superior a esse valor, conferindo maior robustez à interpretação dos resultados (MRC HOLLAND, 2025).

4.11.4 Sequenciamento Genético de Nova Geração

O sequenciamento genético de nova geração foi realizado com dois painéis: um painel customizado, contendo de 625 genes relacionados às leucemias linfoides pediátricas, selecionados a partir de artigos científicos, manuais da OMS e de outras instituições (e.g., LeukemiaNet, NCCN); e um painel comercial, o TruSight RNA Fusion Panel (Illumina) de 507 genes de interesse envolvidos em fusões.

O input utilizado para o preparo das bibliotecas foi de 100 ng de RNA por amostra. A quantificação do RNA foi realizada com o kit Qubit RNA Broad Range e a quantificação das bibliotecas foi feita com o kit Qubit DNA Broad Range (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. A qualificação das amostras e bibliotecas foi conduzida no sistema TapeStation (Agilent Technologies), utilizando kits específicos para cada tipo de molécula (RNA – pré biblioteca e DNA – biblioteca). As bibliotecas foram preparadas

utilizando o painel comercial TruSight RNA Fusion (Illumina) ou um painel customizado, seguindo estritamente os protocolos dos fabricantes. Ambos os painéis eram de sequenciamento do tipo paired-end, com índices single (TruSight) ou dual (painel customizado). As leituras foram realizadas com extensão de 75 pares de bases, com uma média de 4,5 milhões de reads por amostra. As corridas de sequenciamento foram realizadas na plataforma NextSeq 1000 (Illumina), com concentração final de 700 pM de biblioteca por corrida.

Devido ao tempo disponível para a execução das análises e à exigência de etapas rigorosas de validação, optou-se pela utilização de um painel comercial amplamente validado para todas as amostras.

4.11.4.1 Processamento e Controle de Qualidade dos Dados

Os dados brutos provenientes do sequenciamento de RNA (RNA-Seq) foram submetidos a um rigoroso controle de qualidade com o objetivo de remover leituras de baixa qualidade, adaptadores e contaminantes técnicos. Ferramentas como *FastQC* e *MultiQC* foram utilizadas para avaliar parâmetros de qualidade, incluindo a distribuição do tamanho dos fragmentos, conteúdo de bases por ciclo e presença de artefatos técnicos. Para garantir a qualidade das corridas de sequenciamento, foram adotados critérios mínimos como pontuação de qualidade $Q30 \geq 90\%$, percentual de *reads* com *passing filter* $\geq 80\%$, taxa máxima de duplicatas $\leq 20\%$ e número mínimo de leituras por amostra de pelo menos 2,5 milhões. Apenas as amostras que atenderam a esses critérios foram consideradas para as etapas subsequentes de análise.

4.11.4.2 Alinhamento ao Genoma de Referência

As leituras filtradas foram mapeadas contra o genoma de referência humano (versão GRCh38/hg38) utilizando o alinhador STAR (*Spliced Transcripts Alignment to a Reference*), em sua versão mais recente disponível no momento da análise (2.7.11). O STAR foi executado em modo de duas passagens (*two-pass mode*), permitindo a detecção mais sensível de sítios de *splicing* e aumentando a acurácia do mapeamento de transcritos alternativos.

4.11.4.3 Detecção de Genes de Fusão

A análise de fusões gênicas foi conduzida utilizando três ferramentas complementares: Arriba, STAR-Fusion e CICERO. A análise do Arriba foi integrada diretamente ao alinhamento

gerado pelo STAR, aproveitando as informações de *chimeric reads* para identificar eventos de fusão com alta precisão. Posteriormente, foi utilizado o STAR-Fusion de forma independente, também a partir dos arquivos de saída do STAR, para fornecer uma segunda camada de validação e identificação de eventos adicionais. Por fim, o CICERO foi utilizado como ferramenta complementar para a detecção de fusões baseadas em evidências estruturais, aumentando a sensibilidade da análise e permitindo a identificação de fusões menos expressas ou atípicas. As fusões detectadas foram posteriormente filtradas com base em critérios de qualidade, leitura de suporte e anotação funcional.

4.11.4.4 Análise de Expressão Gênica

A quantificação da expressão gênica foi realizada com base nas leituras mapeadas, utilizando a contagem de *reads* por gene. Os dados de contagem foram então normalizados e submetidos à análise de expressão diferencial por meio do pacote DESeq2 (Bioconductor), que utiliza modelos estatísticos baseados em distribuições binomiais negativas para identificar genes diferencialmente expressos entre os grupos comparados. Genes com valor de p ajustado (FDR) $< 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.11.4.5 Identificação de variantes somáticas

Os arquivos BAM resultantes foram processados com o Picard Tools para marcação de duplicatas, ordenação e indexação. Em seguida, foi utilizada a ferramenta SplitNCigarReads, parte do GATK (versão 4.3), para ajustar os alinhamentos de transcritos contendo splicing, de forma a torná-los compatíveis com as etapas subsequentes de chamada de variantes.

A identificação de variantes somáticas foi realizada com o Mutect2 (GATK) que foi configurado com filtros otimizados para dados de RNA-Seq, incluindo profundidade mínima de leitura ($DP \geq 100$), frequência alélica variante (VAF) mínima de 30% e suporte por pelo menos 5 leituras em ambas as direções. As variantes chamadas foram submetidas à etapa de filtragem com o FilterMutectCalls, também do GATK, visando a remoção de falsos positivos com base em métricas como base quality, strand bias e mapping quality.

As variantes finais foram anotadas e interpretadas utilizando a plataforma Franklin da empresa Genoox (<https://franklin.genoox.com/>), que integra diretrizes internacionais como as da ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) e fornece informações clínicas e funcionais relevantes, incluindo frequência populacional (como gnomAD), predições

in silico de patogenicidade, dados de literatura científica e evidências de bancos de dados clínicos. Variantes classificadas como benignas ou de significado incerto (VUS) foram analisadas com cautela, priorizando aquelas com possível relevância funcional ou clínica.

Vale destacar que a chamada de variantes em dados de RNA-Seq apresenta limitações técnicas em comparação com dados genômicos, tais como viés de cobertura devido à expressão diferencial dos genes, presença de artefatos de splicing e ausência de regiões intergênicas, o que pode impactar a sensibilidade e a especificidade da detecção de variantes. Por isso, todas as análises foram conduzidas com rigor, buscando maximizar a reprodutibilidade e a confiabilidade na detecção de variantes somáticas potencialmente relevantes.

4.12 Análise estatística

A análise estatística refere-se a um estudo observacional e analítico, com delineamento longitudinal, baseado em dados de pacientes pediátricos com LLA-B atendidos no serviço de Oncologia do Hospital da Criança de Brasília (HCB).

As análises realizadas incluíram abordagens descritivas (média, mediana, desvio padrão, valores mínimo e máximo, e amplitude interquartil), curvas ROC, análise de sobrevivência (Kaplan-Meier e teste de Log-rank de Mantel-Cox) e testes de associação (Qui-quadrado de Pearson, teste exato de Fisher, razão de chances e U de Mann-Whitney).

Os dados foram compilados no software Microsoft Excel (2016) e analisados no SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 23 (IBM Corp., 2015), com testes bilaterais e nível de significância de 5%.

A curva ROC (Receiver Operating Characteristic) é uma ferramenta estatística amplamente utilizada para avaliar o desempenho de testes diagnósticos, permitindo a determinação de pontos de corte que otimizam a sensibilidade e especificidade de um marcador na discriminação entre diferentes desfechos clínicos.

5 Resultados

5.1 Caracterização epidemiológica da coorte

A coorte é composta por 132 pacientes diagnosticados com LLA-B dos subtipos de interesse no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2022. Desses quais 56,8% (75) são do sexo masculino e 43,2% (57) do sexo feminino (Tabela 4 /Figura 6).

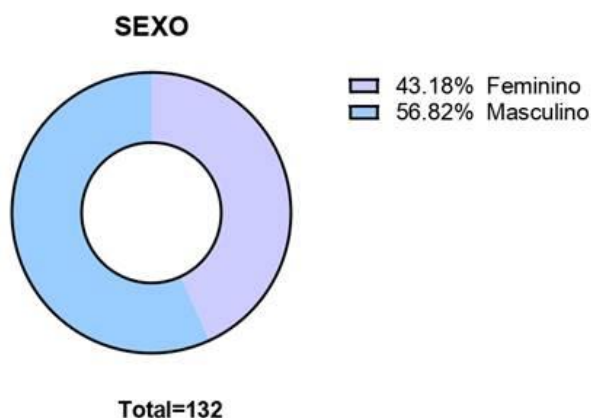


Figura 6. Distribuição dos 132 pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-B dos subtipos de interesse do estudo, entre janeiro de 2012 e dezembro de 2022 segundo o sexo, evidenciando 56,8% (n = 75) do sexo masculino e 43,2% (n = 57) do sexo feminino.

Como visto na figura 7, 55,3% (72) dos pacientes eram originários do Distrito Federal (DF) e os outros 44,7% (59) eram de outros 7 estados do Brasil.

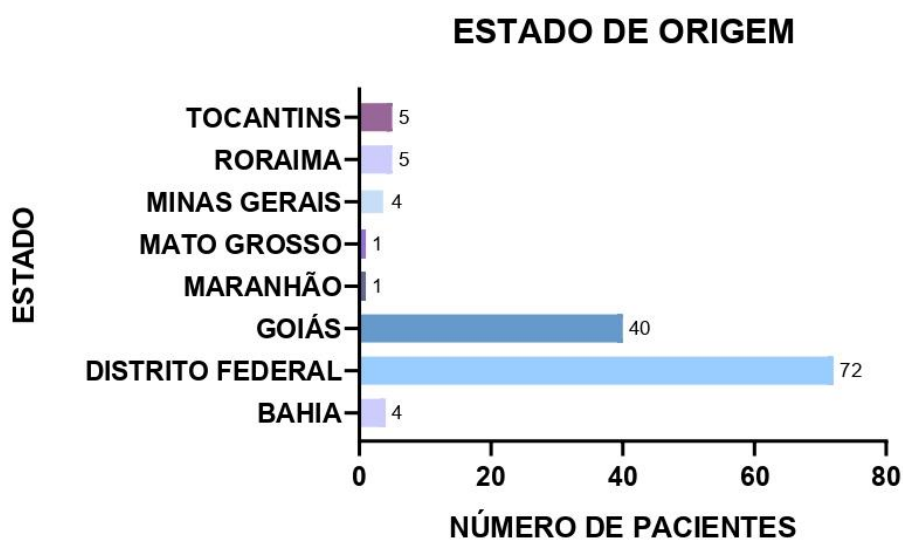


Figura 7. Distribuição dos 132 pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse do estudo entre 2012 e 2022 segundo o estado de origem, mostrando que 55,3% (n = 72) eram originários do Distrito Federal e 44,7% (n = 59) de outros sete estados brasileiros.

No período de 2018 a 2022, quando a disponibilidade dos exames para identificação de alterações recorrentes foi uniforme, foi possível caracterizar todos os casos de LLA-B. A Tabela

5 apresenta a frequência de cada alteração observada, assim como as respectivas frequências descritas na literatura.

Tabela 5. Frequência de alterações genético moleculares de casos de todos os subtipos de LLA-B diagnosticados no período de 2018-2022 no Hospital da Criança de Brasília, comparando suas frequências com as frequências descritas na literatura.

	Alteração	Pacientes avaliados (n)	Alterados (n)	Frequência (%)	% descrita	Referência
Citogenética	Alta Hiperdiploidia	126	42	33,3	25-30	(Lejman <i>et al.</i> , 2022)
	Baixa hiperdiploidia		11	8,7		10-11
	Alta hipodiploidia		3	2,4	0,5	(Comeaux e Mullighan, 2017)
	Baixa hipodiploidia		5	3,9 (0,6 isolada)		
	Alteração estrutural		16	12,7		
RT-PCR	<i>ETV6::RUNX1</i>	156	38	24,3	25-30	(Lejman <i>et al.</i> , 2022)
	<i>TCF3::PBX1</i>		9	5,8	2-6	(Hein <i>et al.</i> , 2019)
	<i>BCR::ABL</i>		4	2,7	10-20	(Conant e Czuchlewski, 2019)
	<i>rKMT2A</i>		2	0,3	5	(Górecki <i>et al.</i> , 2023)

No que diz respeito à frequência genótipos da coorte de bom prognóstico durante todo o período do estudo (2012-2022), 52,28% dos pacientes apresentavam a fusão *ETV6::RUNX1* (47,73% (63) exclusivos e 4,55% (6) com aneuploidias concomitantes à fusão), 15,91% a fusão *TCF3::PBX1* (21) e 31,82% a alta hiperdiploidia (42) (Figura 8).

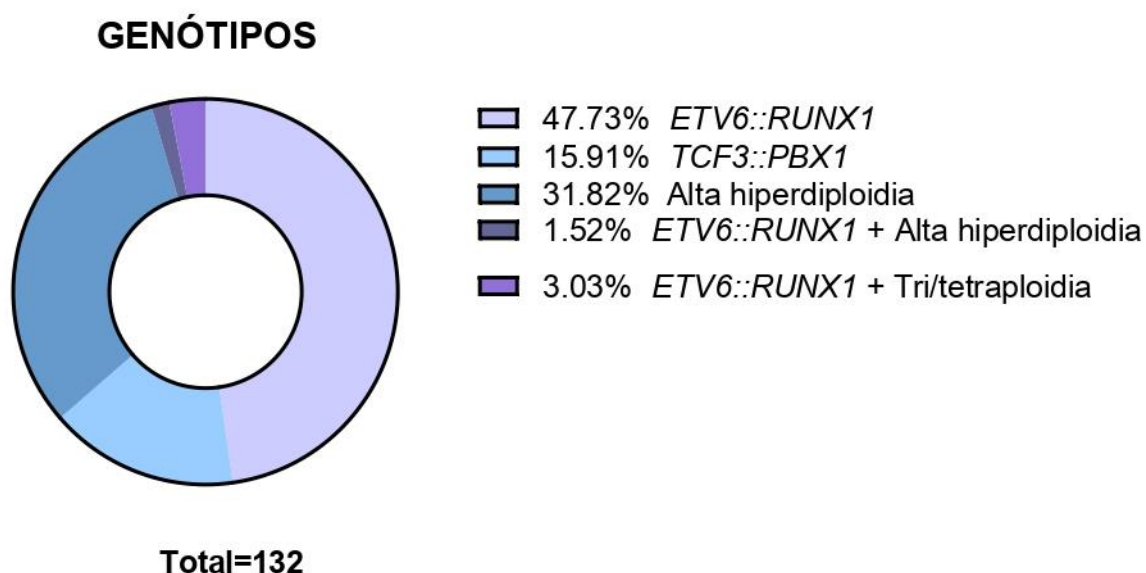


Figura 8. Frequência dos genótipos de bom prognóstico na coorte de 132 pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse entre 2012 e 2022: fusão *ETV6::RUNX1* em 52,3% (exclusiva em 47,7%, n = 63; concomitante com aneuploidias em 4,6%, n = 6), fusão *TCF3::PBX1* em 15,9% (n = 21) e alta hiperdiploidia em 31,8% (n = 42).

Entre os pacientes com a translocação *ETV6::RUNX1* exclusiva, 47,6% eram do sexo feminino e 52,4% do sexo masculino. Nos portadores da fusão *TCF3::PBX1*, 52,4% eram do sexo feminino e 47,6% do sexo masculino. Já entre os pacientes com alta hiperdiploidia exclusiva, 41% eram do sexo feminino e 59% do sexo masculino (Figura 9).

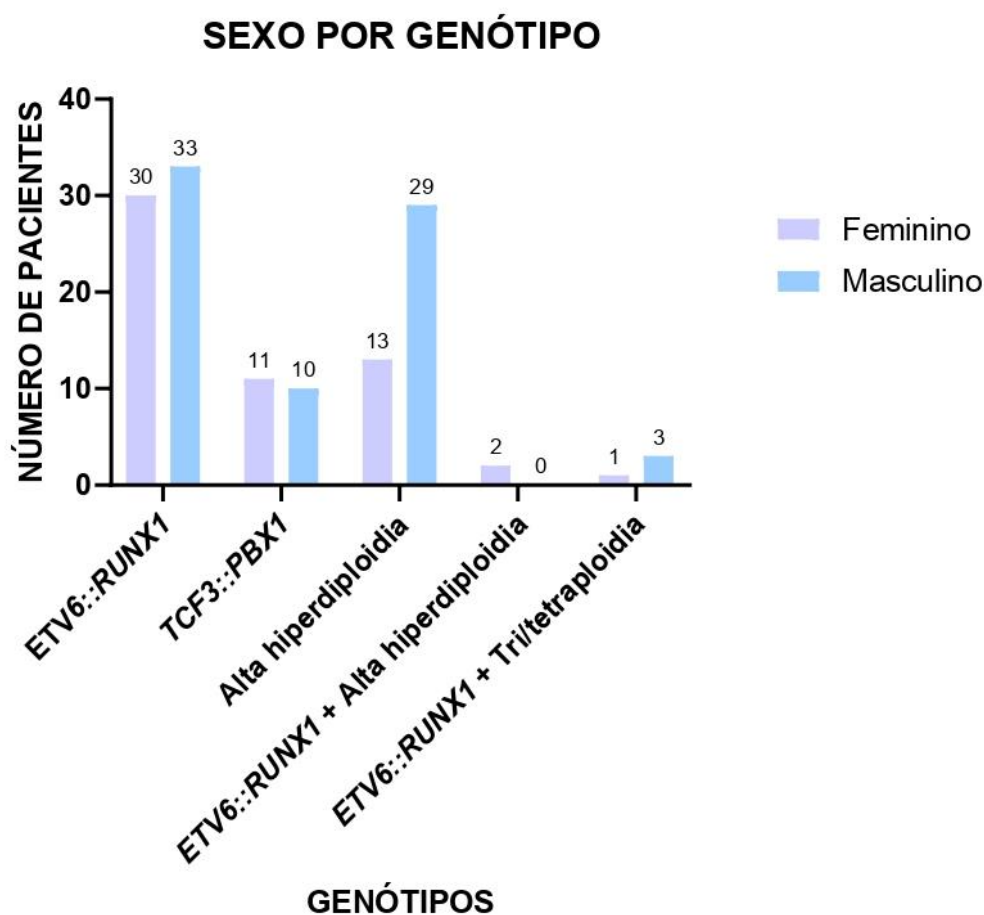


Figura 9. Distribuição dos 132 pacientes com LLA-B entre 2012 e 2022 por sexo em cada genótipo de bom prognóstico. No grupo *ETV6::RUNX1* exclusiva, 47,6% eram do sexo feminino e 52,4% do masculino; na fusão *TCF3::PBX1*, 52,4% do sexo feminino e 47,6% do masculino; na alta hiperdiploidia exclusiva, 41% do sexo feminino e 59% do masculino.

Ao diagnóstico, apenas 6% (8) apresentaram infiltração de sistema nervoso central, e um dos pacientes não teve seu líquido avaliado por imunofenotipagem (Figura 8/Tabela 5). Desses oito pacientes, três são do genótipo *ETV6::RUNX1*, um *TCF::PBX1* e quatro pertencem ao grupo de alta hiperdiploidia.

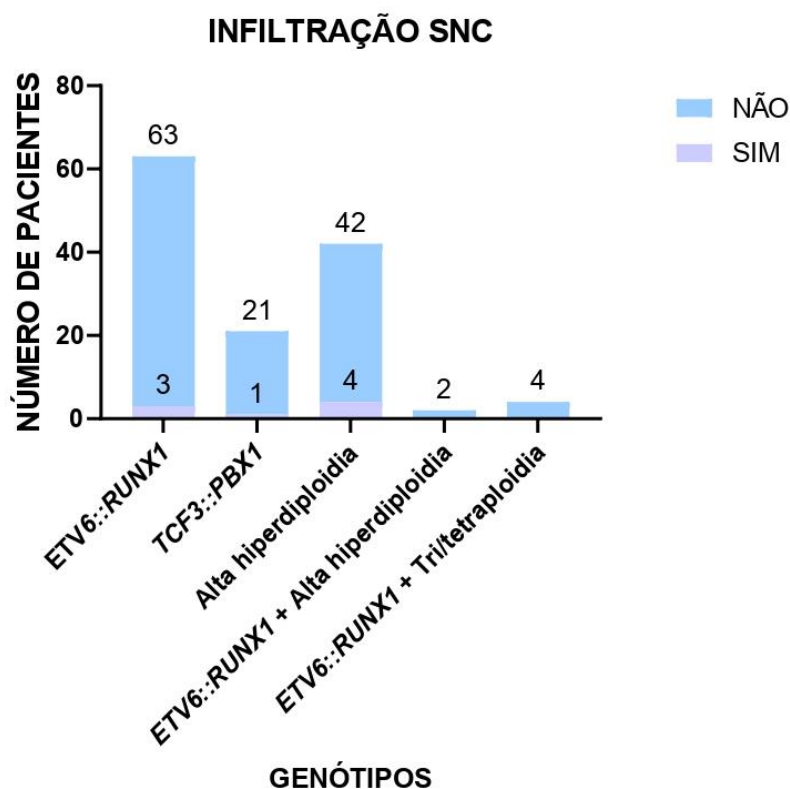


Figura 10. Número de pacientes com infiltração do sistema nervoso central (SNC) ao diagnóstico entre os 132 pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse avaliados entre 2012 e 2022. Ao diagnóstico, 6% (n = 8) apresentaram infiltração do SNC; um paciente não teve líquido avaliado por imunofenotipagem. A distribuição por genótipo inclui três pacientes com *ETV6::RUNX1*, um com *TCF3::PBX1* e quatro com alta hiperdiploidia.

Em relação às complicações, 25% (33) dos pacientes apresentaram infecções, 7,6% (10) desenvolveram trombose e 3,8% (5) tiveram sangramentos com repercussão clínica. Falha na resposta ao tratamento foi observada em 2,3% (3) dos casos, enquanto 15,2% (20) apresentaram complicações não especificadas nos prontuários. Nenhum paciente abandonou o tratamento (Tabela 5).

Tabela 5. Análise descritiva dos dados clínicos de pacientes pediátricos atendidos no serviço de Oncologia do HCB diagnosticados com LLA-B, no Laboratório de Pesquisa Translacional (LPT), de janeiro de 2012 a dezembro de 2022.

	n	%
Sexo		
Masculino	75	56,8

	Feminino	57	43,2
Translocação	t(1;19)	21	23,3
	t(12;21)	69	76,7
	Não se aplica	42	
Hiperdiplóide	Não	84	63,6
	Sim	48	36,4
Subtipo	t(1;19)	21	15,9
	t(12;21)	69	52,3
	Hiperdiplóide	42	31,8
Múltiplas recaídas	Não	20	78,3
	Sim	5	21,7
	Não se aplica	107	
Complicações – Infecção	Não	99	75,0
	Sim	33	25,0
Complicações – Trombose	Não	122	92,4
	Sim	10	7,6
Complicações - Sangramento com repercussão clínica (SNC, pulmonar, TGI, hemodinâmica)	Não	127	96,2
	Sim	5	3,8
Complicações - Falha de resposta	Não	129	97,7
	Sim	3	2,3
Complicações - Abandono de tratamento	Não	132	100,0
Complicações – Outro	Não	112	84,8
	Sim	20	15,2
Classificação de Risco Diagnóstico	Baixo risco	52	45,2
	Risco intermediário	41	35,7
	Alto risco	22	19,1
	Não classificado	17	
Classificação de risco no fim da indução	Baixo risco	34	37,0
	Risco intermediário	37	40,2

	Alto risco	21	22,8
	Não classificado	40	
SNC	Não	123	93,9
	Sim	8	6,1
	Não avaliado	1	
Status SNC	SNC 1	124	93,9
	SNC 2	6	4,5
	SNC 3	2	1,5
Protocolo de Tratamento	GBTLI 93	26	19,7
	GBTLI 99	3	2,3
	BFM 2009	39	29,5
	GBTLI 2021	3	2,3
	BFM95	61	46,2
Total		132	100,0

Aproximadamente 20% (26) dos pacientes foram submetidos ao protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância (GBTLI) de 1993, 2,3% (3) foram tratados com GBTLI de 1999, por serem pacientes com síndrome de Down, e outros 2,3% (3) com GBTLI de 2021. Além disso, outros três pacientes foram submetidos à múltiplos protocolos de tratamento. A maior porção de pacientes foi teve seu tratamento baseado em protocolos do grupo Berlin-Frankfurt-Münster (BFM), sendo 43,9% (58) com o protocolo de 1995 e outros 29,5% (39) com o protocolo de 2009 (Figura 11).

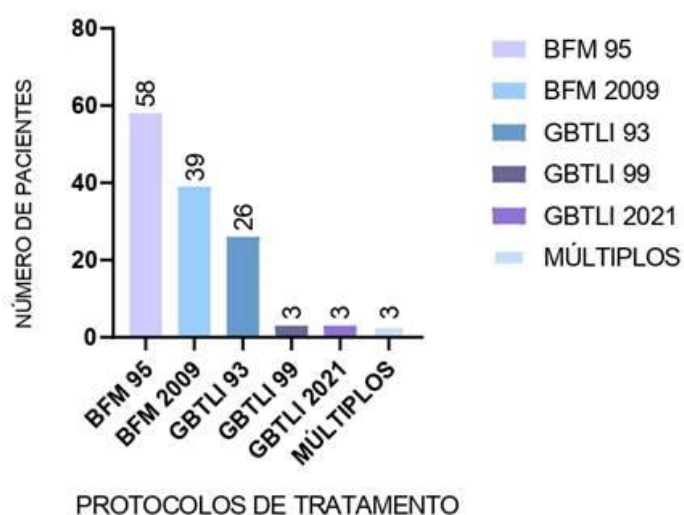


Figura 11. Distribuição dos 132 pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse entre 2012 e 2022 segundo os protocolos de tratamento utilizados. Aproximadamente 20% foram tratados pelo protocolo GBTLI93, 2,3% pelo GBTLI99, 2,3% pelo GBTLI2021 e uma pequena parte recebeu múltiplos protocolos. A maior proporção da coorte seguiu protocolos do grupo Berlin-Frankfurt-Münster (BFM), sendo 43,9% com BFM95 e 29,5% com BFM2009.

Ao diagnóstico, com base nos critérios estabelecidos pelos protocolos utilizados, 39,4% (52) dos pacientes foram classificados como baixo risco provisório, 31,1% (41) como risco intermediário provisório e 16,7% (22) foram classificados como alto risco provisório. Dezesete pacientes não foram classificados ao diagnóstico. Já ao final da indução, 25,8% (34) dos pacientes estavam classificados como baixo risco definitivo, 28% (37) como risco intermediário definitivo e 15,9% (21) como de alto risco definitivo. Já os pacientes não classificados, nesse *timepoint*, representam 30,3% (40). Na figura 12, é possível visualizar a distribuição dos pacientes em relação à classificação de risco por genótipo.

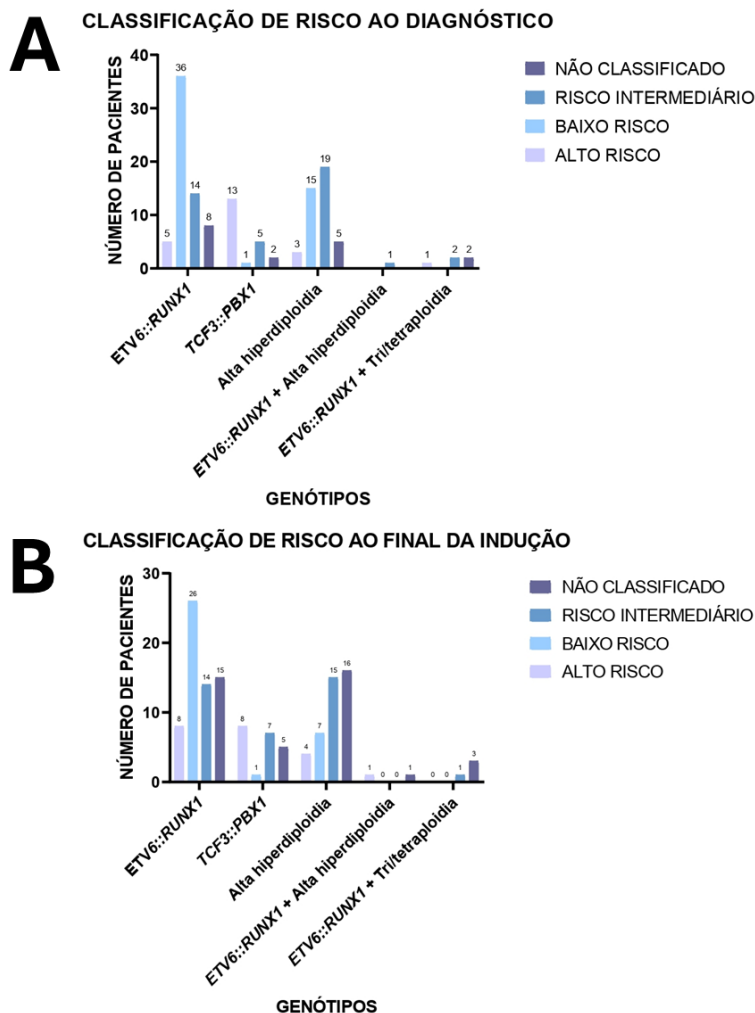


Figura 12. Classificação de risco dos 132 pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse, ao diagnóstico (A) e ao final da indução (B) segundo os protocolos utilizados e por genótipo. Ao diagnóstico, 39,4% foram classificados como baixo risco provisório, 31,1% como risco intermediário provisório, 16,7% como alto risco provisório e 12,9% não classificados. Ao final da indução, 25,8% estavam em baixo risco definitivo, 28% em risco intermediário definitivo, 15,9% em alto risco definitivo e 30,3% não classificados.

Considerando toda a coorte, a mediana de idade ao diagnóstico foi de quatro anos, variando de 0 a 17 anos (Figura 13).

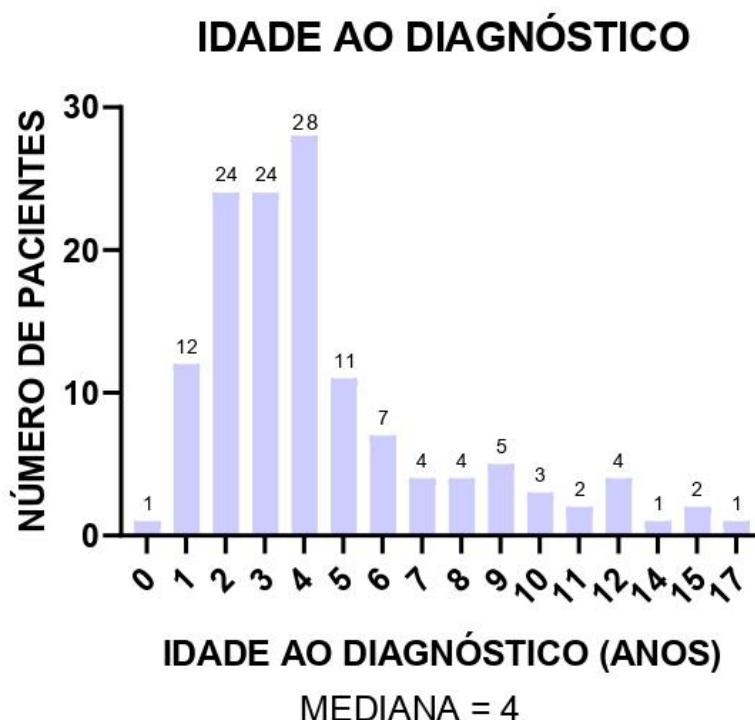


Figura 13. Distribuição dos pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse, diagnosticados entre 2012 e 2022 no Hospital da Criança de Brasília, por idade ao diagnóstico, onde a mediana foi de 4 anos (intervalo de 0 a 17 anos).

Levando em consideração os grupos genotípicos incluídos neste estudo, o grupo com a translocação *ETV6::RUNX1*, apresentou a mediana de idade ao diagnóstico de 3 anos, com intervalo de 1 a 10 anos. Para os pacientes com *TCF3::PBX1*, a mediana foi de 5 anos, com intervalo de 1 a 17 anos. Aqueles com alta hiperdiploidia apresentaram mediana de 3,5 anos, com intervalo de 0 a 15 anos. Por fim, os pacientes com *ETV6::RUNX1* associada a alguma aneuploidia tiveram mediana de 7,5 anos, com intervalo de 2 a 15 anos (Figura 14).

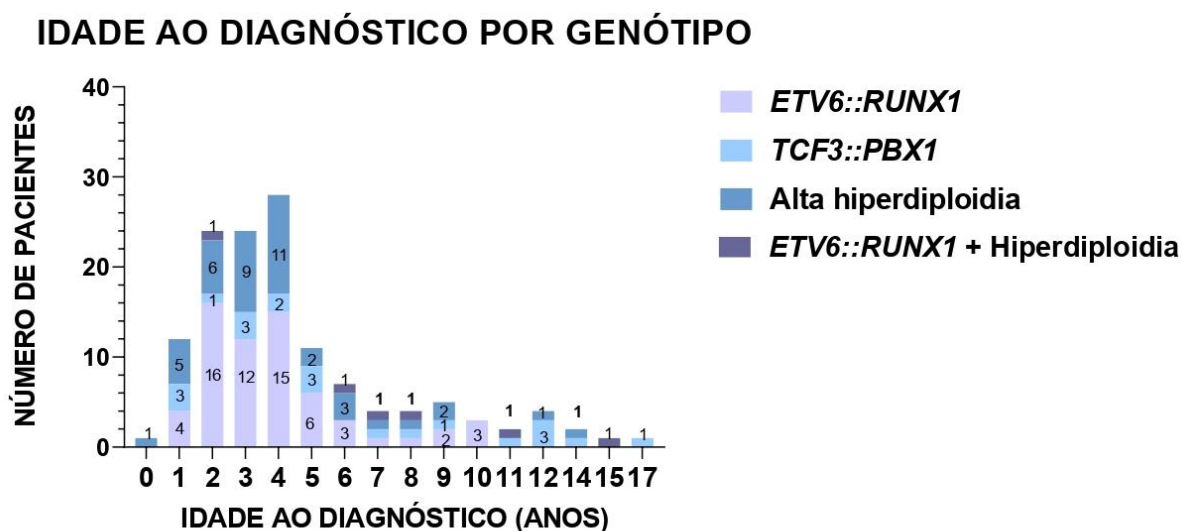


Figura 14. Distribuição dos pacientes com LLA-B, diagnosticados entre 2012 e 2022, no Hospital da Criança de Brasília por idade ao diagnóstico, segundo os genótipos de interesse do estudo. A mediana de idade foi de 3 anos para *ETV6::RUNX1*, 5 anos para *TCF3::PBX1*, 3,5 anos para alta hiperdiploidia e 7,5 anos para *ETV6::RUNX1* com aneuploidia.

As leucometrias ao diagnóstico dos 132 pacientes analisados apresentaram uma média de 23.190 células/mm³, com uma mediana de 8.110 células/mm³. O desvio padrão foi de 42.198, indicando uma grande variabilidade nos valores de leucometria entre os pacientes. O valor mínimo registrado foi de 800 células/mm³, enquanto o valor máximo atingiu 300.000 células/mm³, refletindo uma ampla faixa de distribuição das contagens de leucócitos.

No que diz respeito à leucometria dos pacientes por genótipo, observou-se que todos os pacientes com alta hiperdiploidia (n=42) apresentaram leucometria menor ou igual a 50.000 leucócitos/mm³. Entre os 21 pacientes com a fusão *TCF3::PBX1* 15 (71,43%) apresentaram leucometria menor ou igual a 50.000 leucócitos/mm³, enquanto 6 (28,57%) apresentaram valores superiores a isso. No grupo com translocação *ETV6::RUNX1* (n=63), 30 (47,62%) pacientes tinham leucometria menor ou igual a 50.000 leucócitos/mm³ e 33 (52,38%) apresentavam contagens acima desse valor. Por fim, entre os seis pacientes com translocação *ETV6::RUNX1* associada a aneuploidias, quatro (66,67%) apresentaram leucometria menor ou igual a 50.000 leucócitos/mm³, enquanto dois (33,33%) apresentaram valores superiores (Figura 15).

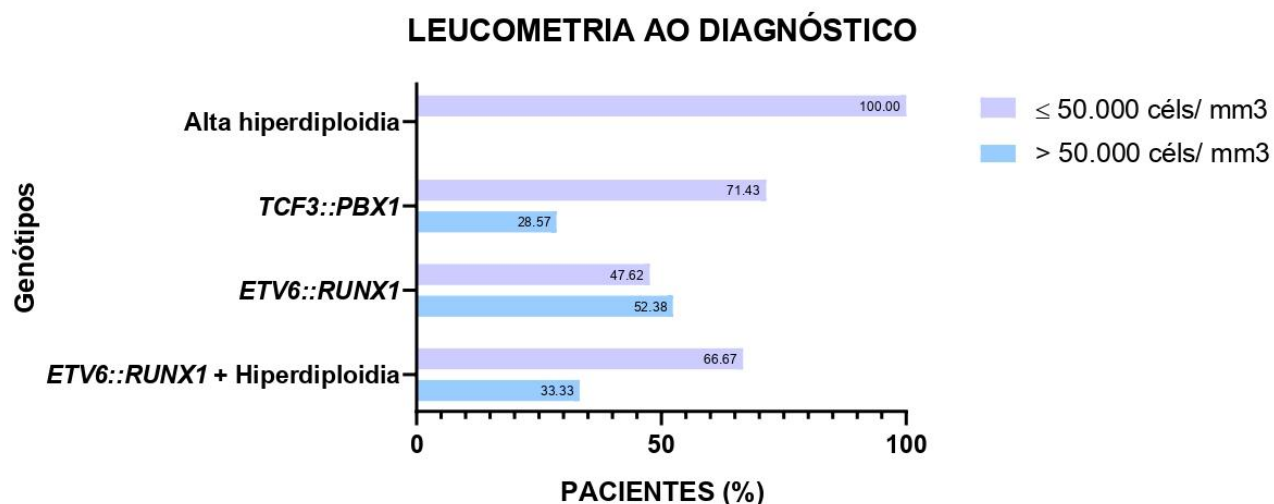


Figura 15. Distribuição dos pacientes com LLA-B por faixa de leucometria ao diagnóstico, segundo os genótipos de interesse dos pacientes diagnosticados com LLA-B, entre 2012 e 2022, no Hospital da Criança de Brasília.

Dos 132 pacientes analisados, 25 (18,9%) apresentaram recaídas, sendo que cinco deles tiveram mais de uma recidiva (Tabela 6). Entre os casos de recaída, 28% pertenciam ao genótipo *t*(12;21), 32% ao *t*(1;19) e 36% apresentavam alta hiperdiploidia. Apenas 4% das recaídas ocorreram em pacientes com a translocação *ETV6::RUNX1* associada a algum tipo de aneuploidia (Figura 16 A). Ao analisar a proporção de recaídas dentro de cada subtipo, observa-se que 11,1% dos pacientes com *t*(12;21) recaíram (7 em 63), enquanto a taxa foi de 33,3% para *TCF3::PBX1* (7 em 21), 21,4% para alta hiperdiploidia (9 em 42) e 33,3% entre os portadores *ETV6::RUNX1* com aneuploidia (2 em 6) (Figura 16 B).

Esses dados reforçam que, embora a translocação *ETV6::RUNX1* esteja associada a bom prognóstico, uma fração dos pacientes ainda pode evoluir com recaída. Além disso, quando essa alteração ocorre em conjunto com aneuploidias, o risco de recidiva parece ser ainda maior. Já o subtipo *TCF3::PBX1* apresenta, de forma consistente, maior risco de recaída.

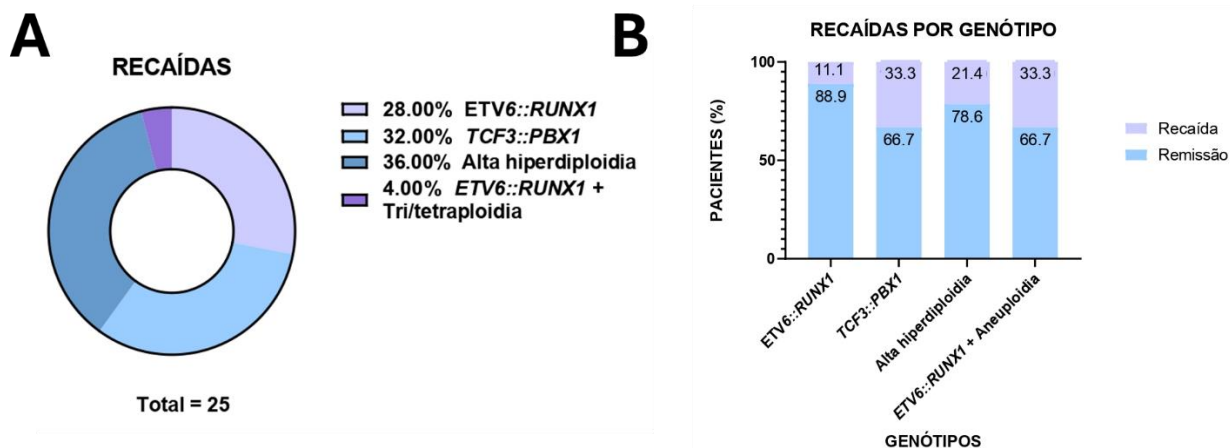


Figura 16. A) Distribuição das recaídas totais entre os 132 pacientes com LLA-B diagnosticados com LLA-B, entre 2012 e 2022, no Hospital da Criança de Brasília segundo os genótipos estudados. No total, 18,9% apresentaram recaída, com 28% das recaídas do grupo *ETV6::*RUNX1**, 32% do grupo *TCF3::*PBX1**, 36% do subtipo alta hiperdiploidia *ETV6::*RUNX1** com aneuploidia. (B) Proporção de pacientes com recaída dentro de cada genótipo estudado.

Quando analisado o tempo até a recaída, observou-se que, no subgrupo *ETV6::*RUNX1**, todas as sete recaídas ocorreram mais de 18 meses após o início do tratamento. Esse foi o mesmo padrão observado nos grupos com hiperdiploidia (9 recaídas) e *ETV6::*RUNX1** associada a aneuploidias (2 recaídas), como visto na Figura 17 - A. Em contraste, no grupo *TCF3::*PBX1**, seis (85,7%) das sete recaídas ocorreram precocemente, antes de 18 meses do início do tratamento.

Em relação ao tempo médio até a recaída, o subtipo *ETV6::*RUNX1** apresentou média de 3,34 anos. Para os casos com t(1;19), o tempo médio foi de 0,88 ano, enquanto nos pacientes com hiperdiploidia foi de 3,02 anos. Já no grupo com *ETV6::*RUNX1** associado a aneuploidias concomitantes, a média foi de 2,8 anos (Figura 17 - B).

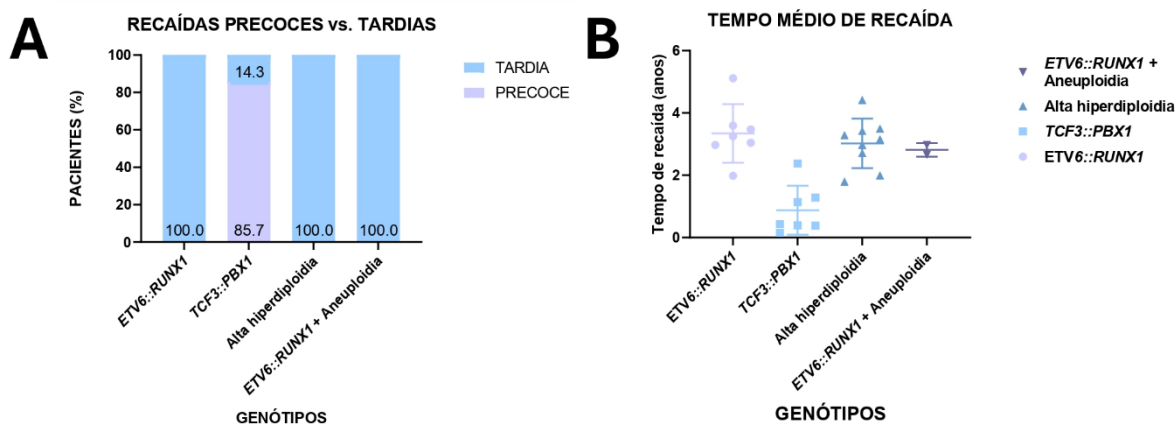


Figura 17. (A) Classificação das recaídas em precoces (<18 meses) ou tardias (≥18 meses) por genótipo entre os pacientes com LLA-B diagnosticados com LLA-B, entre 2012 e 2022, no Hospital da Criança de Brasília. No grupo *ETV6::RUNX1*, todas as recaídas ocorreram tardiamente; o mesmo padrão foi observado em alta hiperdiploidia e *ETV6::RUNX1* com aneuploidia. Em contraste, 85,7% das recaídas em *TCF3::PBX1* foram precoces. (B) Tempo médio até a recaída por genótipo: 3,34 anos para *ETV6::RUNX1*, 0,88 ano para *TCF3::PBX1*, 3,02 anos para alta hiperdiploidia e 2,8 anos para *ETV6::RUNX1* com aneuploidia.

Dos 132 pacientes acompanhados, 14 (11,4%) foram a óbito, seja em decorrência da própria doença ou de complicações associadas. O maior número absoluto de óbitos foi observado no subgrupo *ETV6::RUNX1*, com cinco casos (7,9%), o que pode ser explicado pelo fato de este ser o maior grupo da coorte, com 63 pacientes. Os demais subtipos genéticos (*TCF3::PBX1*, alta hiperdiploidia e *ETV6::RUNX1* com aneuploidia) apresentaram três óbitos cada, o que corresponde a 14,3%, 7,1% e 50% dos pacientes de cada subtipo, respectivamente (Figura 18). Apesar da porcentagem elevada no último subgrupo, esse valor deve ser interpretado com cuidado, já que é a menor amostra da coorte, composta por apenas seis pacientes.

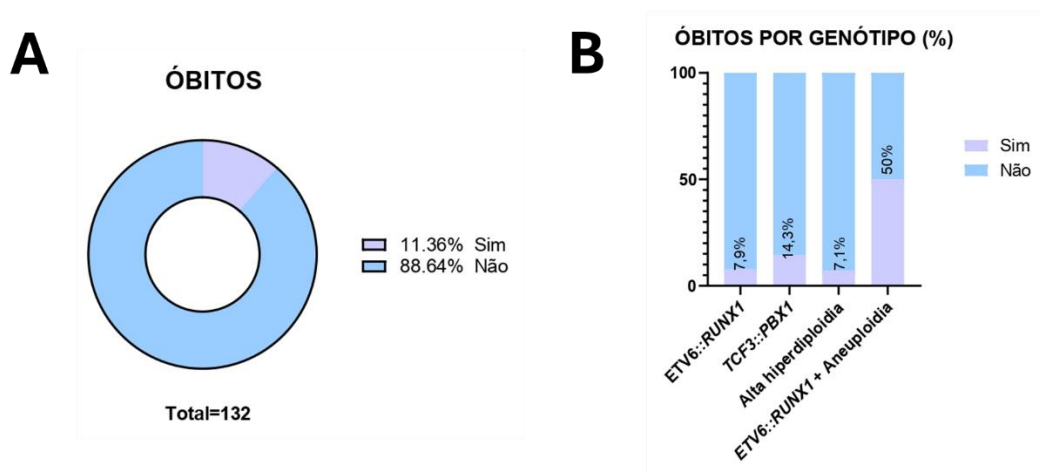


Figura 18. (A) Porcentagem de óbitos na coorte total de 132 pacientes diagnosticados com LLA-B, entre 2012 e 2022, no Hospital da Criança de Brasília. (B) Distribuição dos óbitos (porcentagem) por genótipo de interesse estudado.

Entre os 15 óbitos registrados, sete ocorreram em pacientes com doença ativa, sendo que quatro estavam em recaída no momento do falecimento, incluindo um caso de recaída isolada testicular e outro em sistema nervoso central. Outros quatro pacientes não apresentavam registro de remissão: três vieram a óbito por infecções graves e um por síndrome de ativação macrófagica. Por fim, os quatro pacientes restantes estavam em remissão hematológica, mas faleceram em decorrência de complicações infecciosas. Esses dados destacam que, embora a falha terapêutica e a recidiva contribuam significativamente para a mortalidade, as infecções continuam sendo uma causa relevante de óbito mesmo entre pacientes em resposta ao tratamento.

Ao analisar a associação entre a chance de recaída e diferentes variáveis como sexo, subtipo genotípico, complicações, infiltração no sistema nervoso central (SNC), classificação de risco ao diagnóstico e protocolo de tratamento, por meio do teste qui-quadrado de Pearson, observou-se associação estatística significativa apenas para a classificação de risco ao diagnóstico e o protocolo de tratamento (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de associação entre a recaída e as variáveis clínicas de pacientes pediátricos atendidos no serviço de Oncologia do HCB diagnosticados com LLA-B, no Laboratório de Pesquisa Translacional (LPT), de janeiro de 2012 a dezembro de 2022.

		Recaída		Total	<i>p</i> *	R.C.	I.C.95%	
		Não	Sim					
Sexo	Masculino	N	52	17	69	0,259	0,544	0,214 - 1,379
		%	75,36	24,64	100,00			
	Feminino	N	45	8	53			
		%	84,91	15,09	100,00			
Subtipo	t(1;19)	N	13	7	20	0,115	-	-
		%	65,00	35,00	100,00			
	t(12;21)	N	54	9	63			
	%	85,71	14,29	100,00				
	Hiperdiploide	N	30	9	39			
	%	76,92	23,08	100,00				
Complicações Infecção	Não	N	74	19	93	1,000	1,016	0,363 - 2,847
		%	79,57	20,43	100,00			
	Sim	N	23	6	29			
		%	79,31	20,69	100,00			
Complicações Trombose	Não	n	88	25	113	0,201	-	-
		%	77,88	22,12	100,00			
	Sim	n	9	0	9			
		%	100,00	0,00	100,00			
Complicações Sangramento com repercussão clínica (SNC, pulmonar, TGI, hemodinâmica)	-Não	n	93	25	118	0,580	-	-
		%	78,81	21,19	100,00			
	Sim	n	4	0	4			
		%	100,00	0,00	100,00			
Classificação Risco Diagnóstico	deBaixo risco ao	n	44	5	49	0,024	-	-
		%	89,80	10,20	100,00			
	Risco intermediário	n	30	10	40			
		%	75,00	25,00	100,00			
Alto risco	n	13	8	21				
	%	61,90	38,10	100,00				
Classificação risco no fim da indução	deBaixo risco da	n	28	5	33	0,051	-	-
		%	84,85	15,15	100,00			
	Risco intermediário	n	31	5	36			
		%	86,11	13,89	100,00			
Alto risco	n	12	8	20				
	%	60,00	40,00	100,00				
SNC	Não	n	91	24	115	1,000	0,758	0,085 - 6,801
		%	79,13	20,87	100,00			
	Sim	n	5	1	6			
		%	83,33	16,67	100,00			
Status SNC	SNC 1	n	92	24	116	1,000	-	-
		%	79,31	20,69	100,00			

	SNC 2	n	4	1	5			
		%	80,00	20,00	100,00			
	SNC 3	n	1	0	1			
		%	100,00	0,00	100,00			
Protocolo Tratamento	deGBTLI 93	n	15	10	25	0,024	-	-
		%	60,00	40,00	100,00			
	GBTLI 99	n	2	1	3			
		%	66,67	33,33	100,00			
	BFM 2009	n	32	2	34			
		%	94,12	5,88	100,00			
	GBTLI 2021	n	3	0	3			
		%	100,00	0,00	100,00			
	Outro	n	45	12	57			
		%	78,95	21,05	100,00			
Total	n	97	25	122				
	%	79,51	20,49	100,00				

* Teste Qui-quadrado de Pearson.

Na figura 19, pode-se observar que pacientes submetidos ao GBTLI93 e GBTLI99 apresentaram maior índice de recaída, com 40% e 33,3%, respectivamente. Pacientes tratados com o BFM95 tiveram um índice de recaída de 15,8%, enquanto os tratados com o BFM2009 apresentaram 5,8%. Pacientes submetidos ao GBTLI2021 não sofreram recaídas até o momento avaliado. Já os pacientes que passaram por múltiplos protocolos apresentaram um índice de recaída de 50%, sendo este um valor baseado em apenas dois de quatro pacientes.

RECAÍDAS POR PROTOCOLO DE TRATAMENTO (%)

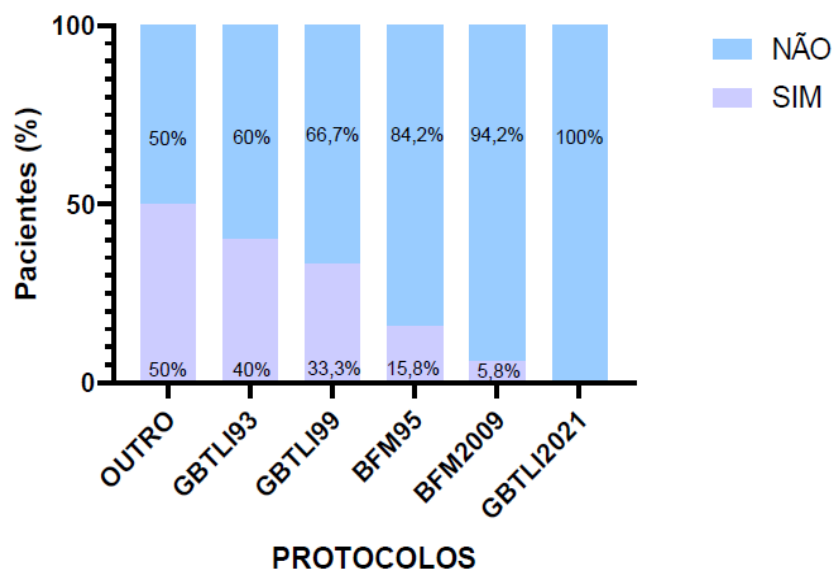


Figura 19. Porcentagem de recaídas entre os pacientes com LLA-B dos subtipos de interesse do estudo, diagnosticados entre 2012 e 2022 no Hospital da Criança de Brasília, segundo o protocolo de tratamento utilizado.

Na avaliação da resposta ao tratamento dos pacientes submetidos ao protocolo GBTL193, no D15, os pacientes com *ETV6::RUNXI* apresentaram uma resposta mais heterogênea. Apesar de 73% terem menos de 5% de blastos, ainda houve casos com percentual entre 5% e 20% e até acima de 20%. Já os pacientes com alta hiperdiploidia mostraram uma resposta mais uniforme, com 80% apresentando menos de 5% de blastos e nenhum caso com valores superiores a esse limite. Por outro lado, o subgrupo *TCF3::PBX1* apresentou a maior proporção de pacientes com DRM positiva no D15, com um terço dos casos apresentando entre 5% e 20% de blastos.

No D33, a 66% dos pacientes avaliados nos três subgrupos apresentou ausência de blastos na medula, indicando resposta adequada ao tratamento nesse estágio. No entanto, o número de pacientes avaliados nesse ponto foi limitado, especialmente no subgrupo *TCF3::PBX1*, dificultando comparações conclusivas (Figura 20).

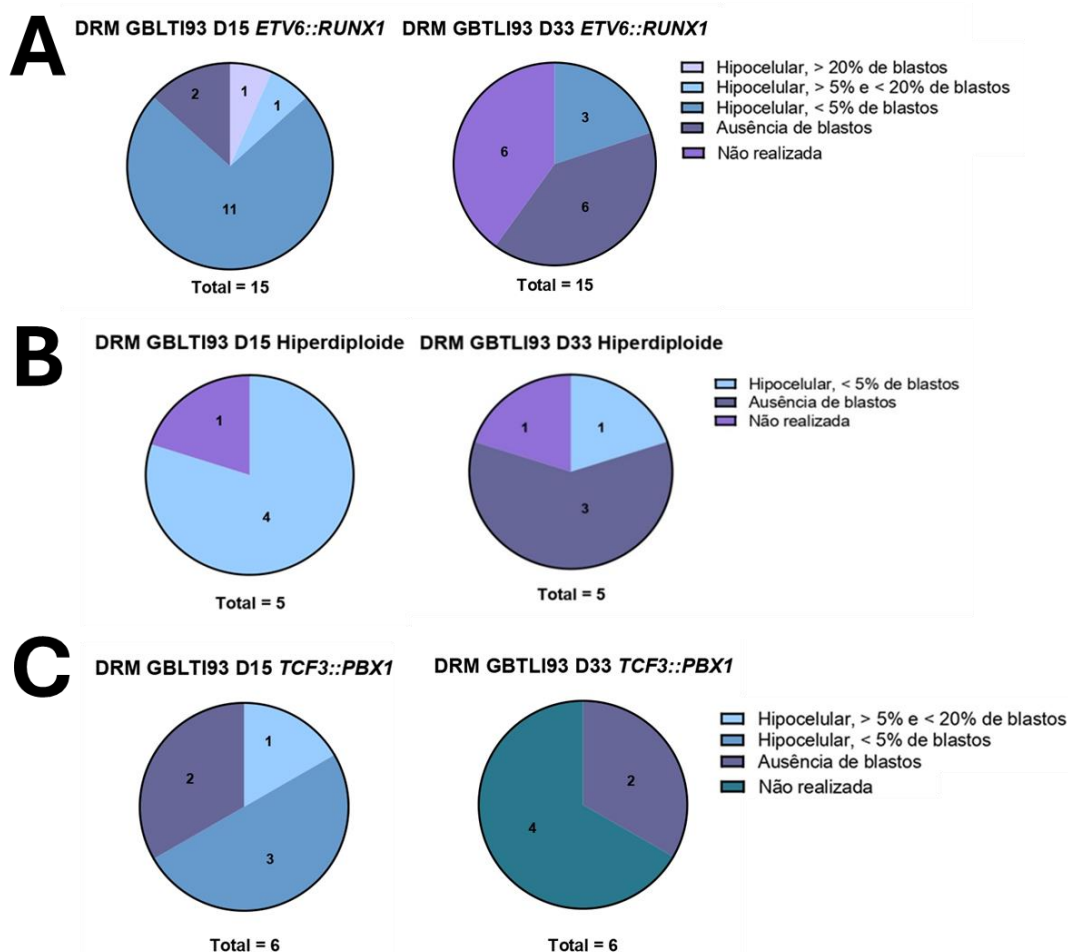


Figura 20. Avaliação da doença residual mínima (DRM) em pacientes submetidos ao protocolo GBLTI93 ao D15 e D33, por genótipo. (A) Em pacientes com *ETV6::RUNX1*, 73% apresentaram <5% de blastos ao D15, com alguns casos entre 5–20% e acima de 20%. (B) Pacientes com alta hiperdiploidia tiveram resposta mais uniforme, com 80% apresentando <5% de blastos e nenhum acima desse limite. (C) No grupo *TCF3::PBX1*, cerca de 33% apresentaram DRM positiva (5–20% de blastos) ao D15. Ao D33, a 4 (66%) dos pacientes avaliados nos três subgrupos apresentou ausência de blastos, indicando resposta adequada, embora o número de pacientes avaliados tenha sido limitado, especialmente em *TCF3::PBX1*.

Apesar de o protocolo BFM95 ter sido o mais frequente entre os pacientes da coorte, os dados referentes à avaliação de doença residual mínima (DRM) neste grupo não foram incluídos nas análises gráficas. Isso devido ao fato de que esse protocolo foi amplamente utilizado durante o período de transição tecnológica no serviço, quando houve a substituição progressiva da análise por mielograma pela citometria de fluxo. Como consequência, há grande

heterogeneidade nos métodos utilizados que possuem uma grande diferença de sensibilidade, além de uma significativa quantidade de dados ausentes ou incompletos, o que comprometeria a interpretação e comparação dos resultados.

Já a avaliação da DRM entre os pacientes tratados com o protocolo BFM2009 (Figura 21) mostrou diferenças na resposta inicial ao tratamento entre os subgrupos genéticos. No D15, o subgrupo com *ETV6::RUNX1* apresentou grande heterogeneidade: apenas 13% apresentaram DRM indetectável, enquanto 30,4% tinham entre 1% e 5% de blastos e dois pacientes (8,6%) apresentaram níveis superiores a 5%, indicando uma resposta mais lenta ao tratamento inicial. No entanto, essa resposta melhorou progressivamente, com 69,6% dos pacientes apresentando DRM indetectável no D33 e 100% no D78.

Entre os pacientes com alta hiperdiploidia, a resposta foi mais uniforme, porém também moderada no D15: apenas 7,1% apresentaram DRM indetectável, e a maioria (57,1%) teve DRM entre 0,1% e 1%. Ainda assim, houve melhora significativa ao longo do tratamento, com 78,6% dos pacientes alcançando DRM indetectável no D33 e 85,7% no D78.

Por fim, o subgrupo *TCF3::PBX1*, embora representado por apenas três pacientes, mostrou resposta inicial variada no D15, com um paciente apresentando DRM superior a 5%. No entanto, a resposta também evoluiu de forma positiva: dois pacientes atingiram DRM indetectável no D33 e todos apresentaram DRM indetectável no D78.

Esses dados indicam que, embora alguns dos pacientes tenha alcançado DRM indetectável até o D78, os níveis iniciais de resposta foram mais heterogêneos no subgrupo t(12;21), sugerindo que a presença dessa fusão genética não garante resposta rápida ao tratamento, especialmente no início da terapia.

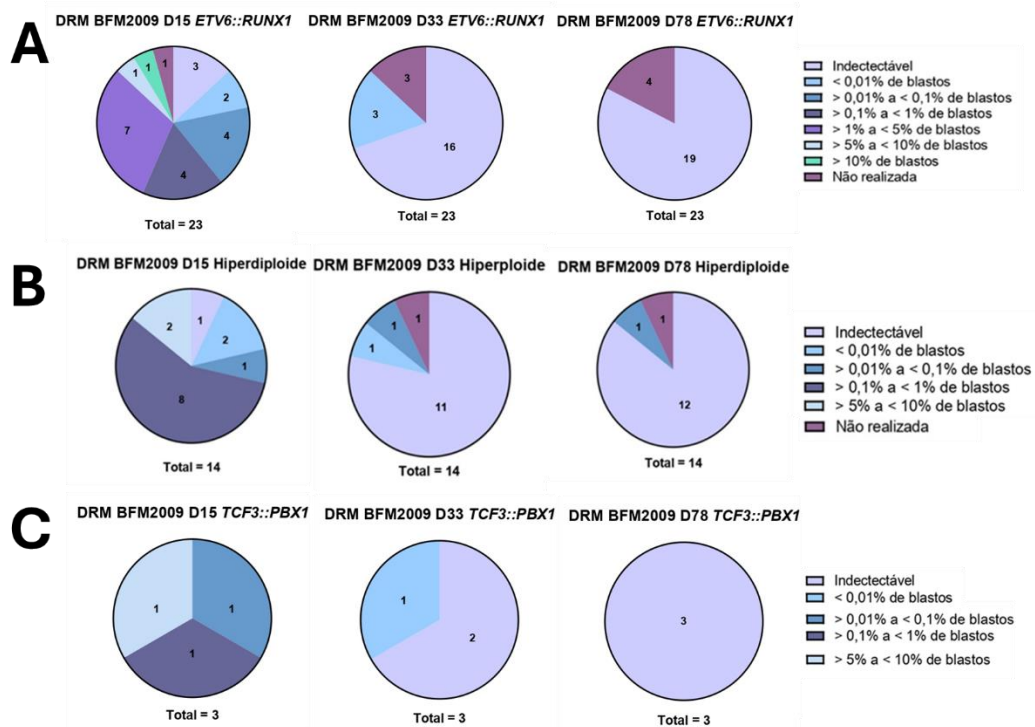


Figura 21. Avaliação da doença residual mínima (DRM) em pacientes submetidos ao protocolo BFM2009 ao D15, D33 e D78, por genótipo. (A) Em pacientes com *ETV6::RUNX1*, 13% apresentaram DRM indetectável ao D15, 30,4% entre 1–5% de blastos e 8,6% acima de 5%; 69,6% atingiram DRM indetectável ao D33 e 100% ao D78. (B) No grupo de alta hiperdiploidia, 7,1% apresentaram DRM indetectável ao D15, 57,1% entre 0,1–1%, 78,6% atingiram DRM indetectável ao D33 e 85,7% ao D78. (C) Em *TCF3::PBX1* ($n = 3$), ao D15 um paciente apresentou DRM >5%; dois pacientes alcançaram DRM indetectável ao D33 e todos atingiram DRM indetectável ao D78.

5.2 Caracterização Genético Molecular

A caracterização genético-molecular desta coorte incluiu pacientes previamente classificados, no momento do diagnóstico, em subtipos específicos: *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1* e alta hiperdiploidia – com base nas metodologias de rotina disponíveis no período. Com o objetivo de expandir a compreensão de mecanismos biológicos associados à recaída e ao desfecho clínico, foi realizada uma análise complementar por sequenciamento de nova geração (NGS) com painéis de RNA em amostras de diagnóstico e acompanhamento. As análises buscaram identificar novas fusões gênicas, alterações no perfil de expressão gênica e, potencialmente, algumas variantes que pudessem servir como marcadores moleculares precoces associados a pior ou melhor prognóstico.

Considerando a utilização de dois painéis de sequenciamento distintos (um customizado e um comercial), foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) utilizando apenas as leituras de regiões localizadas nos genes presentes em ambos os painéis (aproximadamente 150 genes) para permitir a comparação conjunta das amostras e validar o uso da combinação de dados de painéis distintos para o agrupamento das amostras. Observou-se, na figura 22, que as amostras tenderam a se agrupar de acordo com seus respectivos subtipos, indicando que, mesmo considerando os dados de dois painéis distintos, os dados dos genes em comum foram suficientes para discriminar as amostras de forma satisfatória conforme seu perfil de expressão gênica.

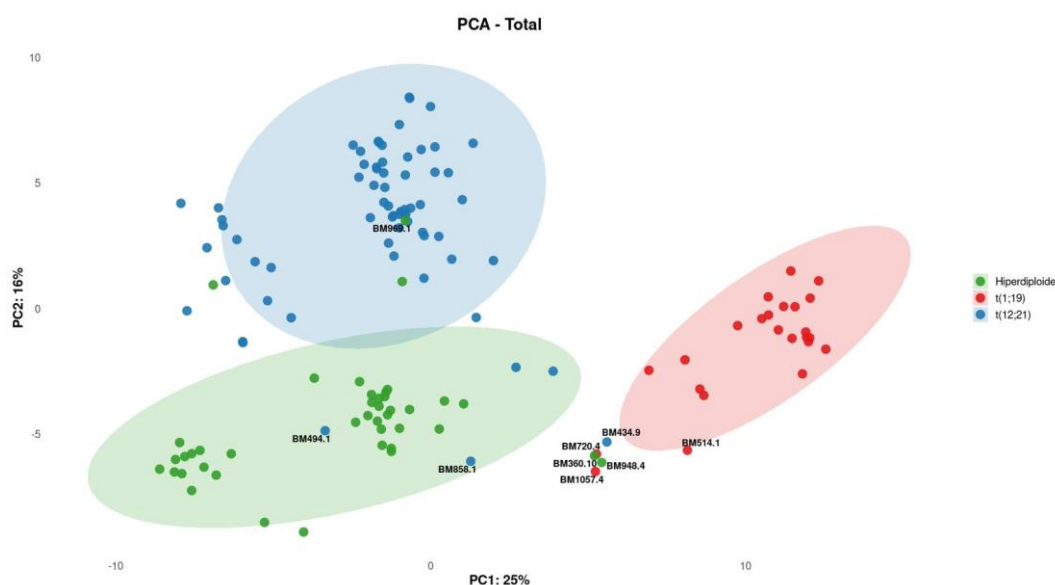


Figura 22. Análise de PCA com base nos perfis de expressão de amostras rodadas em ambos os painéis, a fim de avaliar a concordância entre painéis e validar as análises conjunta de amostras avaliadas em painéis distintos.

Algumas amostras foram identificadas como *outliers* na análise de componentes principais (PCA), apresentando posicionamento fora dos agrupamentos principais. A amostra 969.1, por exemplo, corresponde a um caso hiperdiploide sem diagnóstico prévio da translocação t(12;21); no entanto, o transcrito de fusão *ETV6::RUNX1* foi identificado no *pipeline* de fusões, o que pode justificar sua maior proximidade ao cluster *ETV6::RUNX1*. Já a amostra 858.1 trata-se de um paciente com fusão *ETV6::RUNX1* previamente conhecida e cariótipo com 56 cromossomos, característica compatível com hiperdiploidia, o que pode explicar seu posicionamento. Por fim, a amostra 494.1, apesar de pertencer ao grupo

ETV6::RUNX1, não apresentou alterações no cariótipo, não ficando claro o porquê de sua clusterização junto ao grupo de hiperdiploides.

Devido às limitações dos painéis comerciais amplamente utilizados, que frequentemente apresentam foco em alterações genéticas comuns a tumores sólidos e variantes predominantes em adultos, também utilizamos um painel customizado desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa em parceria com outros centros de pesquisa, voltado especificamente para alterações recorrentes em leucemias pediátricas. Essa abordagem visa suprir lacunas deixadas por painéis genéricos, que muitas vezes não contemplam variantes moleculares clinicamente relevantes na população pediátrica.

Com o objetivo de avaliar a capacidade discriminativa dos genes do painel customizado em relação aos principais subtipos moleculares da leucemia linfóide aguda B (LLA-B), foi gerado um *heatmap* com base no perfil de expressão gênica das amostras classificadas como *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1* e hiperdiploidia (Figura 23). Observou-se que, apesar de um número reduzido de genes, e número de amostras mínimo, o painel customizado capacidade satisfatória de separação entre os subtipos, reforçando seu potencial como ferramenta diagnóstica num contexto de onco-hematologia pediátrica.

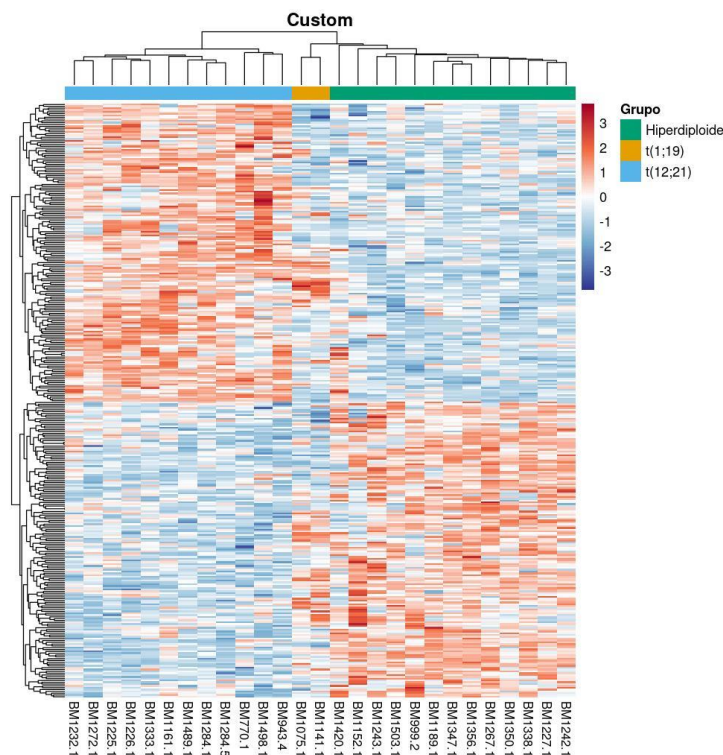


Figura 23. Heatmap com amostras avaliadas pelo painel customizado, agrupadas de forma satisfatória de acordo com suas assinaturas de expressão gênica por subtipo: *ETV6::RUNX1* – tarja azul, *TCF3::PBX1* – tarja laranja e alta hiperdiploidia – tarja verde.

5.2.1 Expressão gênica diferencial por subgrupo molecular

5.2.1.1 Subtipo *ETV6::RUNX1*

Com o objetivo de identificar potenciais biomarcadores prognósticos a partir do perfil de expressão gênica, foram comparadas amostras coletadas no diagnóstico e na recaída de um mesmo paciente, estratificadas por subgrupo. Essa análise buscou verificar se esses pares de amostras apresentavam padrões de expressão distintos, sugerindo alterações moleculares associadas à recaída. Além disso também foram comparadas as amostras de diagnóstico dos pacientes que evoluíram com recaída àquelas de pacientes que permaneceram em remissão, com o intuito de identificar marcadores preditores do desfecho clínico.

Na análise pareada das amostras de diagnóstico e recaída dos pacientes com a translocação *ETV6::RUNX1*, apenas o gene *ZBTB16* teve expressão gênica diferencial de significância estatística (Figura 24).

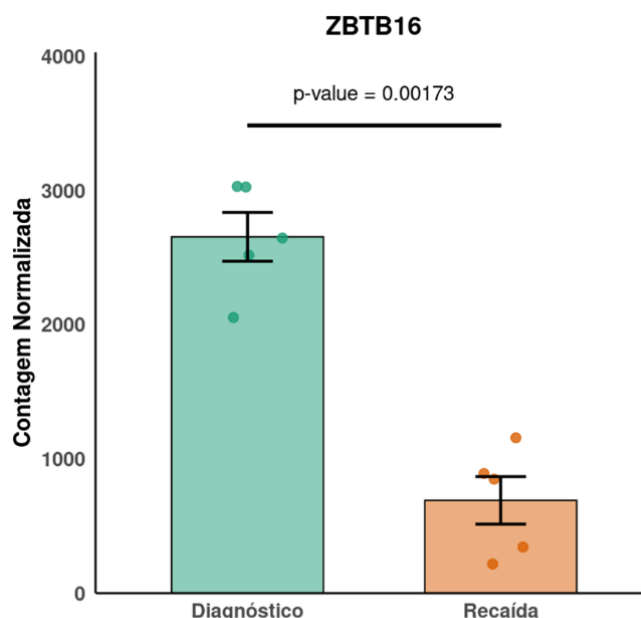


Figura 24. Perfil de expressão do *ZBTB16* em amostras de diagnóstico e recaída dos pacientes do subgrupo *ETV6::RUNX1*, onde observa-se uma maior expressão do gene nas amostras no momento do diagnóstico, com uma contagem de transcritos por milhão mais alta.

Por outro lado, na comparação das amostras, do momento do diagnóstico, entre pacientes que recaíram e daqueles que permaneceram em remissão, não foram encontrados genes diferencialmente expressos com significância estatística.

5.2.1.2 Subtipo *TCF3::PBX1*

Para os quatro pacientes *TCF3::PBX1*, 35 genes apresentaram-se diferencialmente expressos com significância estatística na análise comparativa entre amostras de diagnóstico e recaída, como pode ser visualizado na figura 25. Dentre esses, destacam-se genes envolvidos em vias de apoptose e sobrevivência celular, como *BCL6*, *CBL* e *SETBP1*; em proliferação celular e sinalização do ciclo celular, como *CCND2*, *MYC*, *FGFR2*, *JAK2*, *STAT5B*, *STAT6*, *CRLF2* e *EPOR*; além de genes que regulam a diferenciação hematopoiética, como *IKZF1*, *GATA1* e *CEBPE*. Também foram observadas alterações em genes relacionados à regulação transcricional e epigenética, como *BCOR*, *BCL9*, *MNI* e *AFF3*. Esses achados sugerem que os mecanismos de recaída neste subtipo podem envolver tanto resistência a apoptose quanto estímulo à proliferação e bloqueio de diferenciação.

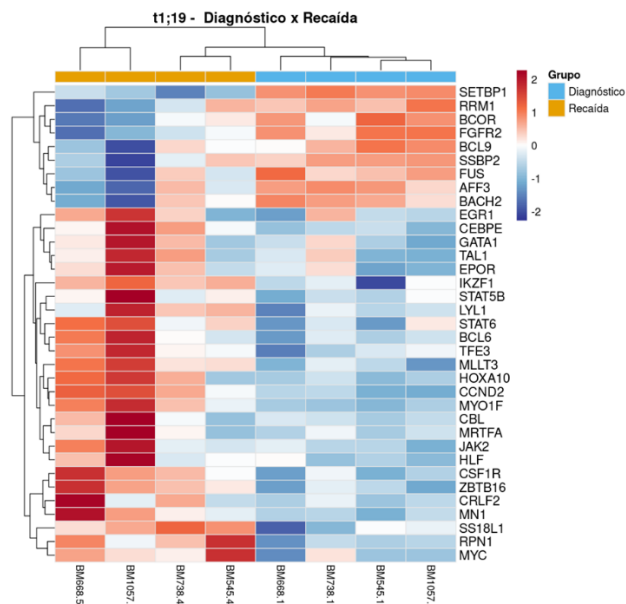


Figura 25. Heatmap de expressão gênica dos genes utilizados para agrupar amostras de diagnóstico e recaída de pacientes *TCF3::PBX1*. As colunas representam as amostras, e as linhas, os genes analisados. A intensidade da cor reflete os níveis de expressão gênica, com tons de vermelho indicando alta expressão, azul indicando baixa expressão e branco representando valores intermediários. Os dados foram normalizados por Z-score e analisados por clusterização hierárquica para identificar padrões de expressão.

Já na análise comparativa entre as amostras com translocação *TCF3::PBX1*, apenas o gene *WT1* apresentou expressão diferencial estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes recaídos e não recaídos (Figura 26).

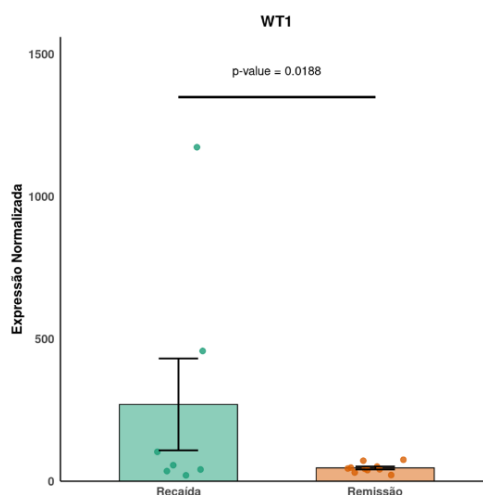


Figura 26. Perfil de expressão do *WT1* em amostras do momento do diagnóstico de pacientes recaídos e não recaídos do subgrupo *TCF3::PBX1*.

5.2.1.3 Subtipo Alta Hiperdiploidia

Para os pacientes com hiperdiploidia, catorze genes apresentaram expressão diferencial estatisticamente significativa na análise comparativa entre amostras de diagnóstico e recaída. Nesse subgrupo, a clusterização com base nesses genes não foi completamente satisfatória, uma vez que duas amostras de recaída se agruparam mais proximamente às amostras de diagnóstico, indicando perfis de expressão semelhantes (Figura 27).

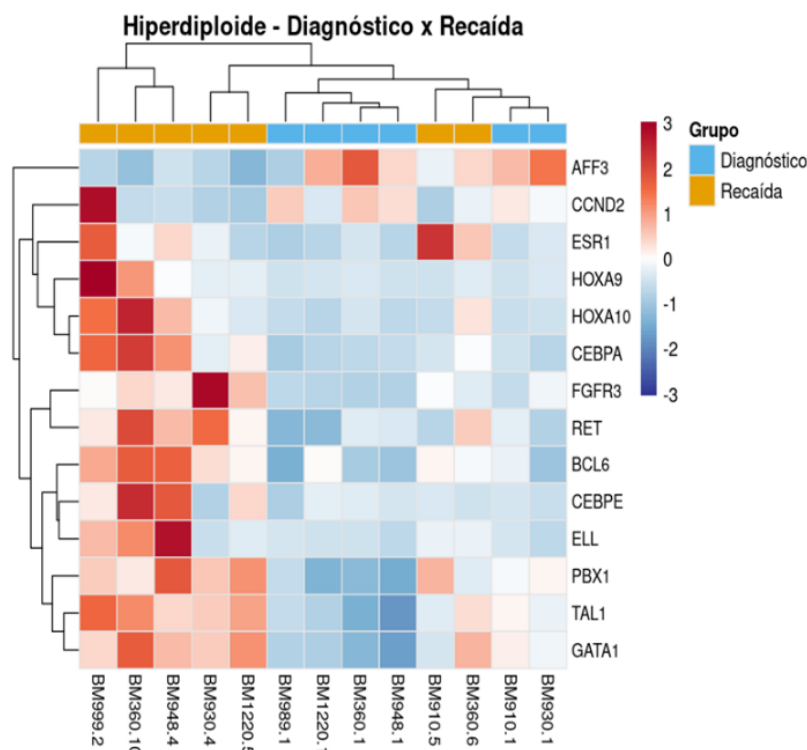


Figura 27. *Heatmap* de expressão de treze genes em amostras do momento do diagnóstico e da recaída. As colunas representam as amostras, e as linhas, os genes analisados. A intensidade da cor reflete os níveis de expressão gênica, com tons de vermelho indicando alta expressão, azul indicando baixa expressão e branco representando valores intermediários. Os dados foram normalizados por Z-score e analisados por clusterização hierárquica para identificar padrões de expressão.

Na comparação entre os perfis de expressão gênica das amostras de diagnóstico de pacientes com alta hiperdiploidia que evoluíram com recaída e aqueles que permaneceram em remissão, os genes *RUNX1*, *CCND2*, *CDK6* e *BCL2* apresentaram expressão diferencial estatisticamente significativa, contribuindo para a separação dos dois grupos (Figura 28).

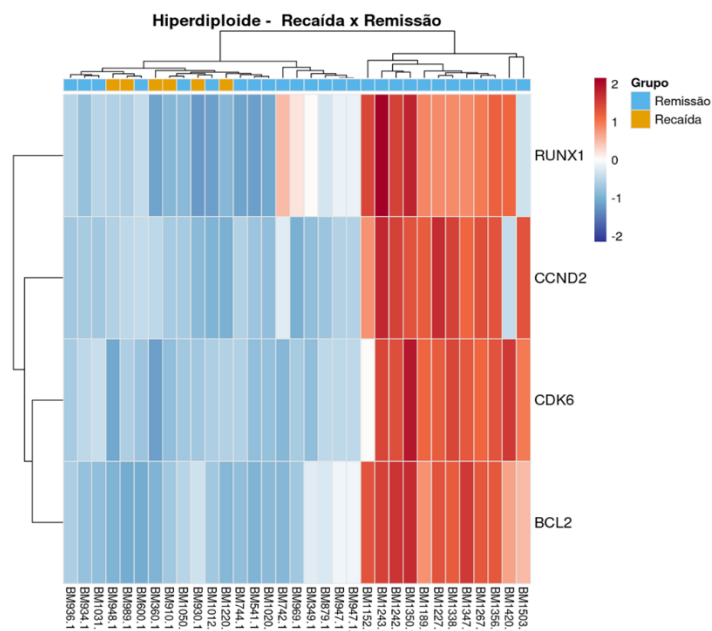


Figura 28. *Heatmap* de expressão gênica de quatro genes em amostras de pacientes recaídos e não recaídos com alta hiperdiploidia. As colunas representam as amostras, e as linhas, os genes analisados. A intensidade da cor reflete os níveis de expressão gênica, com tons de vermelho indicando alta expressão, azul indicando baixa expressão e branco representando valores intermediários. Os dados foram normalizados por Z-score e analisados por clusterização hierárquica para identificar padrões de expressão.

5.2.2 Co ocorrências de alterações moleculares

A tabela 10 resume as alterações genéticas identificadas nos pacientes que apresentaram recaída em cada subgrupo, considerando as amostras disponíveis e as diferentes metodologias empregadas (RT-PCR, cariótipo, MLPA, NGS para fusões e variantes). Entre essas alterações, foram detectadas fusões adicionais, como a *RUNX1::CTCI* em um paciente do subgrupo *ETV6::RUNX1*, além de variações ao nível do DNA identificadas pela MLPA, incluindo duplicações e deleções na região pseudo-autossomal (PAR1) e deleções em genes importantes como *PAX5*, *IKZF1* e *CDNK2A/B*. Também foram encontradas diversas variantes genéticas, sendo a maioria classificada como de significado incerto e uma variante patogênica no gene *CREBBP*.

Além disso, a Tabela 8 apresenta perdas e ganhos de alterações em amostras de pacientes avaliadas nos diferentes momentos de acompanhamento (diagnóstico e recaída), evidenciando um processo de evolução clonal. Observa-se também a manutenção de determinadas alterações ao longo do tempo, o que, em conjunto com as diferenças identificadas

entre os momentos, pode auxiliar na distinção entre mutações *driver*, potencialmente relacionadas à progressão da doença, e *passenger*, sem papel funcional relevante.

Tabela 86. Perfil molecular dos pacientes que tiveram recaída.

Paciente	% de blastos	MLPA	Fusões adicionais (NGS)	Cariótipo	Variante	Classificação das variantes
Hiperdiploidia						
BM 360 BM 360/1	97	-	-	-	<i>NUP98:c.2763G>A</i>	Incerto
BM 360/6 (Recaída 1)	-	-	-	-	<i>FLT3:c.1296G>A</i>	Incerto
BM 360/10 (Recaída 2)	-	<i>EBF1</i> (Dup – 1cp) <i>CDKN2A/B</i> (Del 1 – cp) Dup PAR1	-	-		
BM 910 BM 910/1	84	<i>PARI</i> (Dup) iAMP21 (Dup-4cp)	-	55, XX	<i>CREBBP:c.4337G>A</i> <i>SS18L1:c.471C>T</i> <i>FLT3c.2312A>C</i>	Patogenico Incerto Incerto
BM 910/5 (Recaída)		<i>PARI</i> (Dup) iAMP21 (Dup-4cp)	-	-	<i>CREBBP:c.4337G>A</i> <i>SS18L1:c.471C>T</i> <i>FLT3c.2312A>C</i>	Patogenico Incerto Incerto
BM 930/1	89.8	Ganho do cromossomo 9 (1cp) iAMP21 (Dup-4cp)	-	58, XY	-	-

BM 948 BM 948/1	81.5	<i>EBF1</i> (Dup1 - 1cp) Ganho do cromossomo 9 (1cp) <i>ETV6</i> (Del2- 8/1cp) <i>PARI</i> (Dup - 2cp)	-	59~63,XY,+3,+4,+4,+4,+ 5,+9,+11,+16,+17,+18,+2 0,+21,+21,+22,+3mar[10]	<i>ETV6:c.780_848del</i> <i>NSD1:c.3606G>A</i>	Incerto
BM 948/4 (Recaída)		NR	-	-	<i>NSD1:c.3606G>A</i>	Incerto
BM 969/1	80	NR	-	66, XY	<i>SETBP1:c.3661G>A</i>	Incerto
BM 999/2	-	DEL <i>IKZF1</i> (hetero); DEL <i>PAX5</i> ex6 (hetero)	-	52~54,XY,+X,+del(4)(q), +6,+8,+21,+2mar[10]/46, XY[10]	<i>CREBBP:c.4337G>A</i> <i>FLT3:c.1773_1774del</i> <i>AFF3:c.1237A>G</i> <i>CDH11:c.981G>A</i> <i>NUP98:c.4629G>A</i> <i>ABL1:c.3225C>A"</i>	Patogenico Incerto Incerto Incerto Incerto
BM 1220 BM 1220/1	91.25	<i>PARI</i> (Dup - 2cp) iAMP21 (Dup-4cp)	-	54~60,XX[6]/46,XX[9]	<i>NUP98:c.5135G>A</i>	Incerto
BM 1220/5 (Recaída)		NR	-	-	<i>NUP98:c.5135G>A</i>	Incerto

BM 1242/1	94.9	<i>IKZF1</i> (Del Δ4-8 /hetero) <i>CDKN2A/B</i> (Del A e B - 2cp) iAMP21 (Dup-4cp)	-	53~55,XY,+X,+X,+4,+10 ,+17,+18,+21,+mar,+mar[21]/46,XY[4]	<i>PICALM:c.1516G>A</i> <i>NSD1:c.3606G>A</i>	Incerto
BM 1267/1	88.7	PAR1 (Dup - 2cp)	-	50~53,XX,+X,+14,+17,+18,+19,+21[5]/46,XX[8]	<i>NT5C2c.325C>G</i>	Incerto
<i>ETV6::RUNXI</i>						
BM 374/1	93	NR	-	46, XX Recaída: 47, XX +21 [16]/ 46,XX [13]	<i>FHIT:c.118C>T</i> <i>NUP98:c.3992C>T</i> <i>IKZF1:c.311C>T</i>	Incerto
BM 434/1	70	NR	-	-	-	-
BM 565/5 (Recaída)	79	NR	-	-	-	Incerto
BM 770/3 (Recaída 1)	68.6	<i>BTGD</i> Del PAR1	-	76~85, XY, r(?) [19]/46, XY[6]	<i>SMARCB1:c.236A>T</i>	Incerto
BM 943 BM 943/1	77.8 77.8	<i>PAX5</i> (Del2,5,6 - 1cp)	-	46,XX	<i>NTRK1:c.1925C>T</i>	Incerto
BM 943/4 (Recaída)	97.7	<i>PAX5</i> (Del2,5,6 - 1cp)	<i>LOC643201::ATRX;</i> <i>ETV6::RUNXI</i> 3 breakpoints		<i>NTRK1:c.1925C>T</i> <i>NCOA3:c.1728C>A</i>	Incerto

35~44,XX,t(12;21)(p13;q22),inc[cp15]/46,XX						
BM 1072/1	82.5	<i>PAX5</i> (Del2-7 -1cp) <i>ETV6</i> (Del1-5 -1cp)	-	46,XY	<i>INPP5D:c.470G>A</i>	Incerto
BM 1284 BM 1284/1	85.9	<i>ETV6</i> (Del1-1- 8 /1cp) <i>PARI</i> (DEL – 1cp)	<i>RUNX1::CTCI</i>	46, XY	<i>NCOA3:c.3176C>G</i> <i>STAT6:c.1923T>C</i> <i>MLLT6:c.2000T>C</i>	Incerto
BM 1284/5 (Recaída)	81.8	<i>ETV6</i> (Del1-1- 8 /1cp) <i>PARI</i> (DEL – 1cp)	<i>RUNX1::CTCI</i>	46,XX,t(12;21)(p13;q22)[5]/46,XX[15]	<i>NCOA3:c.3176C>G</i> <i>STAT6:c.1923T>C</i> <i>MLLT6:c.2000T>C</i> <i>ABL2:c.3225C>A</i>	Incerto
BM 1333/1	65.8	<i>ETV6</i> (Del ex2 /1cp) iAMP(Del <i>RUNX1</i> ex2 /1cp)	-	N/A	<i>BCR:c.791A>G</i> <i>KAT6A: c.3885G>A</i>	Incerto
<i>TCF3::PBX1</i>						
BM 447/1	84	NR	-	-	<i>CLTC:c.1450G>A</i> <i>ELL:c.1643G>A</i> <i>AFF1:c.240T>G</i>	Incerto
BM 505/1	94	NR	-	-	<i>AFF3:c.2778C>T</i>	Incerto

BM 545 BM 545/1	95	NR	-	-	<i>ZNF521:c.240T>C</i> <i>STAT6:c.1218G>A</i>	Incerto
BM 545/4		NR	-	-	<i>NSD2:c.3448A>G</i>	Incerto
BM 668 BM 668/1	50	NR	-	-	-	-
BM 668/5		NR	-	-	-	-
BM 738 BM 738/1	73	NR	-	-	<i>BCL9:c.4270A>G</i> <i>LYL1:c.258G>A</i>	Incerto
BM 738/4		NR	-	-	<i>BCL9:c.4270A>G</i> <i>LYL1:c.258G>A</i> <i>PDGFRB:c.2130G>A</i>	Incerto
BM 1057 BM 1057/1	94.3	NR	-	46,XY t(1;19)(q23;p13)	<i>CCND3:c.23G>A</i> <i>PIM1:c.179_184dup</i> <i>DUSP22:c.316G>A</i>	Incerto
BM 1057/4		-	-	-	<i>CCND3:c.23G>A</i> <i>PIM1:c.179_184dup</i> <i>DUSP22:c.316G>A</i>	Incerto

Legenda das alterações genéticas detectadas por MLPA nas amostras de pacientes que apresentaram recaída: NR- Não realizado; “-”: sem alterações; Del: deleção; Dup: duplicação; ex: éxon deletado ou duplicado; cp: número de cópias deletadas ou duplicadas; PAR1: região pseudoautossômica 1.

Já a análise conjunta da classificação de risco e das alterações genético-moleculares (Tabela 8) nas amostras de pacientes que recaíram mostrou padrões distintos entre os subgrupos. Nos casos de alta hiperdiploidia, predominaram pacientes inicialmente classificados como risco intermediário ou baixo, com alterações recorrentes como ganho de cromossomo 21 (+21), região PAR1 e alterações em *IKZF1*, *PAX5*, *CDKN2A/B* e *EBF1*. No subgrupo *ETV6::RUNX1*, a maioria foi classificada inicialmente como baixo ou intermediário risco, e foram detectadas alterações por MLPA, como deleções em *PAX5* e região PAR1, além de variantes por NGS, incluindo *RUNX1::CTCI* e *RUNX1*. No subgrupo *TCF3::PBX1*, predominou a classificação inicial como alto risco, com ausência de alterações detectáveis por MLPA e poucas variantes identificadas por NGS. O número relativamente elevado de casos “não classificados” pode estar relacionado à defasagem no preenchimento dos prontuários médicos.

Tabela 87. Classificação de risco e alterações genético-moleculares nas amostras de pacientes que apresentaram recaída.

ID	ANO DO DIAGNÓSTICO	SUBGRUPO	RISCO INICIAL	RISCO FINAL	ALTERAÇÕES MLPA	ALTERAÇÕES NGS
BM 360	2012	Alta hiperdiploidia	AR	AR	<i>EBF1/CDNK2A/B/</i> PAR1 (recaída)	-
BM 910	2017	Alta hiperdiploidia	RI	NC	PAR1; +21/+21	<i>CREBBP</i>
BM 930	2017	Alta hiperdiploidia	RI	NC	+9/+21	-
BM 948	2017	Alta hiperdiploidia	RI	NC	<i>EBF1; ETV6;</i> PAR1	-
BM 969	2017	Alta hiperdiploidia	RI	NC	NR	-
BM 999	2015	Alta hiperdiploidia	BR	BR	<i>IKZF1; PAX5</i>	<i>CREBBP</i>
BM 1220	2020	Alta hiperdiploidia	BR	BR	PAR1; +21	-
BM 1242	2020	Alta hiperdiploidia	BR	AR	<i>IKZF1; CDKN2A/B;</i> +21	-
BM 1267	2020	Alta hiperdiploidia	RI	RI	-	-
BM 374	2012	<i>ETV6::RUNXI</i>	BR	BR	NR	-
BM 434	2012	<i>ETV6::RUNXI</i> + AH	AR	AR	NR	-
BM 565	2014	<i>ETV6::RUNXI</i>	AR	AR	NR	-
BM 770	2016	<i>ETV6::RUNXI</i> + Aneuploidia	RI	NC	<i>BTG;</i> PAR1	-
BM 943	2017	<i>ETV6::RUNXI</i>	RI	RI	<i>PAX5</i>	-
BM 1072	2018	<i>ETV6::RUNXI</i>	RI	RI	<i>PAX5</i>	-
BM 1284	2020	<i>ETV6::RUNXI</i>	NC	RI	PAR1	<i>RUNXI::CTCI</i>

BM 1333	2021	<i>ETV6::RUNXI</i>	RI	RI	<i>RUNXI</i>	-
BM 505	2013	<i>TCF3::PBX1</i>	AR	AR	NR	-
BM 545	2013	<i>TCF3::PBX1</i>	BR	BR	NR	-
BM 668	2014	<i>TCF3::PBX1</i>	AR	AR	NR	-
BM 738	2015	<i>TCF3::PBX1</i>	RI	RI	NR	-
BM 1057	2018	<i>TCF3::PBX1</i>	NC	NC	NR	-

Legenda: Classificação de risco e alterações genético-moleculares identificadas por MLPA e NGS nas amostras de pacientes que apresentaram recaída. Risco inicial: classificação atribuída no diagnóstico; risco final: classificação atribuída após a avaliação de resposta ao final da indução. NC: não classificado; RI: risco intermediário; BR: baixo risco; AR: alto risco. MLPA: Del: deleção; Dup: duplicação; PAR1: região pseudoautosômica 1; ex: éxon deletado ou duplicado; cp: número de cópias deletadas ou duplicadas; NR – Não realizado; “-”: sem alterações. Alterações NGS: variantes detectadas por sequenciamento de nova geração.

5.3 Microambiente tumoral

A adoção, pelo laboratório, de um painel mais amplo de anticorpos para avaliação da doença residual mínima (DRM) contendo marcadores de células estromais, como CD81, CD73, CD10 e CD34, nos permitiu fazer uma reanálise dos arquivos de citometria com foco na identificação e caracterização das células estromais nos pacientes diagnosticados com LLA-B, visando compreender melhor a composição celular desse compartimento no contexto da leucemia.

Esse painel expandido foi utilizado em 43 dos pacientes incluídos neste estudo, possibilitando a análise detalhada do microambiente medular nesses casos. Entre esses pacientes, 26 (60,47%) apresentavam o subtipo genético *ETV6::RUNX1*, 15 (34,88%) eram hiperdiploides e 2 (4,65%) tinham a fusão *TCF3::PBX1*. Houve discreto predomínio do sexo feminino (23/43; 53,49%) (Tabela 9).

No que diz respeito à classificação de risco dos pacientes analisados, 19 pacientes (55,88%) foram considerados de baixo risco ao diagnóstico e 15 (44,12%) de risco intermediário; nove não foram classificados. Ao final da indução, 12 (37,50%) permaneciam como baixo risco e 20 (62,50%) como risco intermediário, com 11 pacientes não classificados.

A maioria dos pacientes não apresentou recaída (40/43; 93,02%) e encontrava-se viva até o último momento de avaliação (38/43; 88,37%). Complicações infecciosas ocorreram em 14 pacientes (32,56%), enquanto trombose e sangramento com repercussão clínica foram observados em 5 (11,63%) e 2 (4,65%) casos, respectivamente (Tabela 9).

Em relação à doença residual mínima (DRM), 39 pacientes (90,70%) apresentaram positividade no dia 15, com queda para 7 (16,28%) no dia 33 e 2 (5,41%) no dia 78. Seis pacientes não apresentavam informação sobre DRM no último tempo.

Tabela 9. Análise descritiva dos dados clínicos de pacientes pediátricos atendidos no serviço de Oncologia do HCB diagnosticados com LLA-B, no Laboratório de Pesquisa Translacional (LPT), de agosto de 2019 a dezembro de 2022.

		n	%
Subtipo	t(1;19)	2	4,65
	t(12;21)	26	60,47
	Hiperdiploide	15	34,88
Sexo	Masculino	20	46,51
	Feminino	23	53,49
Translocação	t(1;19)	2	7,14
	t(12;21)	26	92,86
	Não se aplica	15	
Hiperdiplóide	Não	28	65,12
	Sim	15	34,88
Recaída	Sim	3	6,98
	Não	40	93,02
Complicações			
Infecção	Não	29	67,44
	Sim	14	32,56
Trombose	Não	38	88,37
	Sim	5	11,63
Sangramento com repercussão clínica (SNC, pulmonar, TGI, hemodinâmica)	Não	41	95,35
	Sim	2	4,65
Classificação de risco			
Ao diagnóstico	Baixo risco	19	55,88
	Risco intermediário	15	44,12
	Não classificado	9	
No fim da indução	Baixo risco	12	37,50
	Risco intermediário	20	62,50
	Não classificado	11	
Protocolo de Tratamento			
Óbito	GBTLI 99	1	2,33
	BFM 2009	36	83,72
	Outro	6	13,95
Recaída	Não	38	88,37
	Sim	5	11,63
DRM 15	Não	40	93,02
	Sim	3	6,98
DRM 33	Negativo	4	9,30
	Positivo	39	90,70
DRM 78	Negativo	36	83,72
	Positivo	7	16,28
DRM 78	Negativo	35	94,59
	Positivo	2	5,41
	Sem informação	6	
Total		43	100,00

No contexto deste estudo, com base nos dados dos pacientes submetidos ao painel EuroFlow, que possibilita a identificação detalhada de subpopulações estromais por meio da análise da doença residual mínima (DRM), foi realizada uma análise de curva ROC a

partir das quantificações do microambiente medular. Essa análise indicou um ponto de corte de 14,15% para a frequência de células endoteliais dentro do compartimento estromal, acima do qual foi observada uma associação potencial com um pior desfecho clínico dos pacientes.

A aplicação do ponto de corte identificado (14,15%) na análise de sobrevida, conduzida pelo método de Kaplan-Meier, permitiu a estratificação dos pacientes em dois grupos: alterados (com frequência de células endoteliais acima de 14,15%, associados a pior desfecho clínico) e normais (abaixo desse valor, com melhor evolução). A comparação entre as curvas de sobrevida livre de eventos foi realizada pelo teste log-rank (Mantel-Cox), não atingindo significância estatística ($p = 0,081$). No entanto, as curvas apresentaram trajetórias visivelmente distintas, indicando que, mesmo sem significância formal, esse parâmetro tem potencial para discriminar subgrupos prognósticos dentro da coorte analisada (Figura 29).

Dos 18 pacientes da coorte de microambiente que apresentaram aumento na proporção de células endoteliais no D33, acima do ponto de corte de 14,15%, dois evoluíram para recaída. No total, foram registradas três recaídas no grupo avaliado quanto ao microambiente tumoral, reforçando essa associação. Ambos os pacientes com alteração em células endoteliais pertenciam ao subgrupo com a fusão *ETV6::RUNX1*.

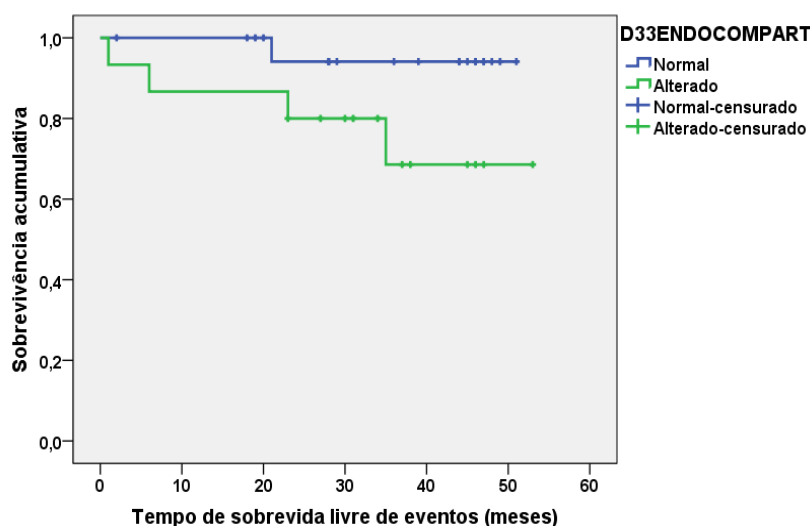


Figura 29. Curva de probabilidade de sobrevida livre de eventos por D33ENDOCOMPART, de Kaplan-Meier, para pacientes pediátricos atendidos no serviço de Oncologia do HCB diagnosticados com LLA-B, no Laboratório de Pesquisa Translacional (LPT), de agosto de 2019 a dezembro de 2022.

Foi realizada uma análise de expressão gênica com o objetivo de identificar possíveis marcadores moleculares associados à alteração na composição do compartimento estromal. Para isso, os pacientes foram estratificados com base no mesmo ponto de corte definido para a proporção de células endoteliais (14,15%). No entanto, não foram identificados genes diferencialmente expressos entre os dois grupos. Apesar da ausência de diferenças significativas, não se pode descartar a presença de alterações moleculares relevantes associadas à fração endotelial, especialmente considerando o número reduzido de amostras incluídas na análise, o que pode ter limitado o poder estatístico para detecção de alterações sutis.

6 Discussão

6.1 Caracterização epidemiológica da coorte

Na coorte analisada, composta por pacientes pediátricos diagnosticados com leucemia linfóide aguda do tipo B (LLA-B) entre os anos de 2012 e 2022, incluindo tanto pacientes do Distrito Federal quanto de outros estados brasileiros, houve um leve predomínio do sexo masculino, o que é comumente observado em estudos sobre LLA infantil (Hunger e Mullighan, 2015a). A distribuição geográfica dos pacientes reflete o papel do Hospital da Criança de Brasília como um centro de referência no atendimento onco-hematológico pediátrico, recebendo casos de diversas regiões do país.

A caracterização das alterações genético-moleculares na coorte geral de LLA-B pediátrica, no período de 2018 a 2022, revelou frequências de subtipos e alterações consistentes com as descritas na literatura internacional. Essa similaridade sugere que a amostra analisada é representativa da população brasileira e que os métodos diagnósticos empregados, incluindo citogenética e técnicas moleculares, foram adequados para a detecção das principais alterações recorrentes. A uniformidade na disponibilidade dos exames nesse período possibilitou uma análise abrangente, reforçando a validade dos dados para a compreensão do perfil molecular da LLA-B em nossa população (Conant e Czuchlewski, 2019; Górecki *et al.*, 2023; Groeneveld-Krentz *et al.*, 2019; Hein *et al.*, 2019; Lejman *et al.*, 2022).

Em relação ao perfil genético nessa coorte, a fusão *ETV6::RUNX1* foi o subtipo mais frequente nesta coorte, seguida pela alta hiperdiploidia e pela fusão *TCF3::PBX1*. Embora a literatura descreva a alta hiperdiploidia como a alteração mais comum em LLA-B pediátrica, o predomínio da fusão *ETV6::RUNX1* em nossa amostra pode refletir

características específicas da população estudada, considerando que a prevalência dos subtipos varia entre diferentes regiões do mundo (Haas e Borkhardt, 2022; Hunger e Mullighan, 2015b; Queiroz *et al.*, 2024).

A distribuição por sexo entre os subgrupos genéticos foi relativamente equilibrada, embora tenha havido predominância masculina na maioria dos subtipos. No caso da fusão *ETV6::RUNX1* e da alta hiperdiploidia exclusiva, observou-se maior frequência de meninos, padrão semelhante ao descrito na literatura para LLA-B pediátrica (Lee, et al., 2021; Qiu et al., 2021). Em contraste, na fusão *TCF3::PBX1* houve discreto predomínio feminino, achado também relatado em estudos como o de Asai et al., (2014), sugerindo possível influência biológica ou epidemiológica nesse subtipo.

A mediana de idade ao diagnóstico dos pacientes da coorte foi de quatro anos, compatível com o pico de incidência da LLA pediátrica, que ocorre entre 2 e 5 anos de idade (Inaba e Pui, 2021). Quando analisados por subtipo genético, os pacientes com a fusão *ETV6::RUNX1* apresentaram mediana de idade mais baixa (3 anos), o que é visto na literatura, como em um estudo realizado na China, onde pacientes com essa alteração apresentavam mediana de idade ao diagnóstico menor quando comparados a pacientes negativos para essa translocação (Qiu *et al.*, 2021b). A alta hiperdiploidia também foi mais frequente em crianças menores (mediana de 3,5 anos), em concordância com a literatura que indica a mediana de 4 anos como a mais reportada, e sendo um subtipo raro após os 7 anos de idade (Panuciak *et al.*, 2023).

Por outro lado, os pacientes com a fusão *TCF3::PBX1* apresentaram mediana de idade ao diagnóstico um pouco mais elevada (5 anos), o que também é condizente com estudos multicêntricos prévios que associam esse subtipo a faixas etárias um pouco mais altas (Zhang *et al.*, 2023). Observou-se ainda que os pacientes com *ETV6::RUNX1* associados a aneuploidias apresentaram uma mediana de idade ao diagnóstico ainda maior (7,5 anos), o que pode sugerir um perfil biológico distinto, porém, o número reduzido de casos nesse grupo limita conclusões definitivas.

A contagem leucocitária ao diagnóstico variou entre os diferentes subgrupos genéticos. Todos os pacientes com alta hiperdiploidia apresentaram leucometria ≤ 50.000 células/mm³, fenômeno descrito na literatura, que associa esse subtipo a valores menores de leucócitos ao diagnóstico (Paulsson e Johansson, 2009). Entre os pacientes com a fusão *TCF3::PBX1*, observou-se que aproximadamente 29% apresentavam leucometria superior a 50.000 células/mm³, refletindo um comportamento mais agressivo já descrito nesse subtipo, quando comparado a outros subgrupos como o *ETV6::RUNX1*, por

exemplo (Al-Kzayer *et al.*, 2023; Queiroz *et al.*, 2024). Por fim, no grupo com a fusão *ETV6::RUNX1*, observou-se uma distribuição mais equilibrada entre os pacientes com leucometria alta e baixa, o que corrobora achados anteriores de que pacientes com essa alteração, apesar de estarem geralmente associado a bom prognóstico, podem apresentar ampla variabilidade clínica, com uma fração dos pacientes apresentando contagem de leucócitos acima de 50.000/ mm³ (Knez *et al.*, 2015).

Embora a infiltração do SNC tenha sido rara nesta coorte, observada em apenas 6% dos pacientes, sua presença tem impacto prognóstico e terapêutico relevante. Esses casos incluíram pacientes com *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1* e alta hiperdiploidia, evidenciando que alterações extramedulares podem ocorrer mesmo em subgrupos considerados de bom prognóstico. A literatura destaca que a detecção precoce dessas infiltrações é essencial para melhorar a sobrevida (Shahriari *et al.*, 2020). Nesse sentido, embora rara, a infiltração de SNC deve ser cuidadosamente monitorada.

As infecções foram a complicação mais frequente durante o tratamento, o que está de acordo com a literatura, que aponta as infecções como os eventos adversos mais comuns em pacientes com LLA (Öztürk, Koç e Zülfiyar, 2021). Esse achado reforça a importância da vigilância contínua e da adoção de medidas de suporte adequadas ao longo da terapia.

Eventos trombóticos e hemorrágicos, embora menos comuns, ocorreram com frequência suficiente para demandar atenção, devido ao seu potencial impacto clínico (Öztürk, Koç e Zülfiyar, 2021). Falha na resposta ao tratamento foi um evento mais raro, o que pode indicar uma boa taxa geral de resposta no grupo avaliado, já esperada por se tratar de subtipos de bom prognóstico. Complicações inespecíficas foram registradas em alguns dos casos, o que pode sugerir tanto limitações na padronização dos registros clínicos quanto a diversidade nas manifestações adversas.

Na classificação de risco inicial, a maior parte dos pacientes foi distribuída entre os grupos de baixo e intermediário risco, com menor proporção no alto risco, padrão semelhante ao descrito em outras coortes pediátricas de LLA-B. Após a indução, houve reclassificação, com redução dos grupos de baixo e intermediário risco, enquanto o grupo de alto risco se manteve estável. Esse resultado reforça a eficácia dos critérios utilizados na classificação inicial, que consideram idade, leucometria e marcadores genéticos, parâmetros bem estabelecidos para estratificação prognóstica na LLA-B (Norén-Nyström *et al.*, 2023).

A redistribuição dos grupos de risco após a indução pode refletir resposta insatisfatória em pacientes inicialmente classificados como baixo ou intermediário risco, reclassificados por critérios como DRM detectável ou ausência de remissão hematológica (Ahmad e Al-Doski, 2024). No entanto, o aumento de pacientes não classificados nesse momento de avaliação (de 12,9% para 30,3%) sugere também influência da ausência de dados ou da aplicação não padronizada dos protocolos ao longo dos anos, evidenciada por falhas no preenchimento dos prontuários observadas durante a coleta.

Quanto aos esquemas terapêuticos, observou-se uma predominância clara da utilização de protocolos do grupo BFM, com destaque para os protocolos de 1995 e 2009. Essa predominância faz sentido justamente pelo período avaliado (2012 a 2022). Protocolos do GBTLI foram menos frequentemente empregados, com maior representação do protocolo de 1993. A diversidade de protocolos utilizados ao longo do período estudado demonstra a evolução das diretrizes terapêuticas. A presença de três pacientes submetidos a múltiplos protocolos pode indicar casos de recaída, toxicidade ou dificuldades de resposta inicial, embora esses casos necessitem de esclarecimento individualizado, indisponível devido à dificuldade de acesso a prontuários mais antigos.

Nesta coorte, 18,9% dos pacientes apresentaram recaídas, incluindo casos com múltiplas recidivas. Em relação à distribuição genética, as recaídas ocorreram principalmente nos subtipos com alta hiperdiploidia e *TCF3::PBX1*, seguidos pela *ETV6::RUNX1*. Apesar de classicamente associada a bom prognóstico, o grupo com a fusão *ETV6::RUNX1* apresentou taxa de recaída de 11,1%, resultado consistente com o descrito na literatura, que aponta taxas entre 2% e 15%, reforçando que mesmo subgrupos favoráveis podem apresentar resistência ou recaída em alguns casos (Liu *et al.*, 2020; Wang, Zeng e Zhang, 2018).

Apesar do bom prognóstico geralmente associado à *ETV6::RUNX1*, observou-se aumento da taxa de recaída para 33,3% nos casos em que essa fusão estava acompanhada por aneuploidias, sugerindo que alterações citogenéticas adicionais podem impactar negativamente o desfecho clínico (Knez *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017, 2021). No entanto, devido ao pequeno número de pacientes nesse subgrupo, esses resultados devem ser interpretados com cautela.

O subtipo *t(1;19)* apresentou uma taxa de recaída de 33,3%, valor consideravelmente superior ao de outros subtipos e compatível com estudos que apontam sua associação com risco intermediário ou alto, especialmente na ausência de tratamentos intensificados (Wang *et al.*, 2021; Yen *et al.*, 2017), que pode justificar recaídas antigas,

em pacientes que foram submetidos a protocolos menos intensificados pela classificação de risco ou pela falta de padronização de profilaxia para infiltrações extramedulares (SNC ou testículo).

O subgrupo de pacientes com alta hiperdiploidia apresentou uma taxa de recaída de 21,4%. Embora esse subtipo também seja geralmente relacionado a bom prognóstico, recaídas podem ocorrer em 10-20% dos casos, especialmente em casos com características genéticas adicionais desfavoráveis (Feusier *et al.*, 2023). Esses achados reforçam a importância da estratificação de risco com base nas características genéticas, sendo necessário considerar a presença de outras alterações genéticas, que podem alterar o prognóstico dos pacientes, levando a um maior risco de recaídas (Sharathkumar *et al.*, 2008).

No grupo com *ETV6::RUNX1*, todas as recaídas ocorreram após 18 meses do início do tratamento, padrão também observado nos pacientes com hiperdiploidia e naqueles com *ETV6::RUNX1* associada a aneuploidias concomitantes. Esses achados vão de acordo com o que é descrito na literatura, que associa esses subtipos a uma clínica menos agressiva e maior probabilidade de recaídas tardias. Além disso, a ocorrência de recaídas mais distantes do diagnóstico tem sido associada a melhor prognóstico após a recidiva, o que contribui para os bons desfechos geralmente observados nesses pacientes (Martineau *et al.*, 2005; Purvis *et al.*, 2025).

Em contrapartida, os pacientes com *TCF3::PBX1* apresentaram um comportamento mais agressivo, com a maioria das recaídas (85,7%) ocorrendo precocemente, ou seja, antes de 18 meses do início do tratamento. Esse padrão é consistente com a literatura, que associa essa fusão gênica a maior risco de recaídas precoces, especialmente no sistema nervoso central. Ainda assim, a intensificação terapêutica dos protocolos mais recentes tem demonstrado uma melhora nos desfechos, atenuando o impacto negativo historicamente atribuído a esse subtipo, embora ele siga sendo considerado de maior risco em comparação a outros grupos (Asai *et al.*, 2014; Felice *et al.*, 2011).

O tempo mediano até a primeira recaída na coorte foi de 35,6 meses (média de 30 meses), com ampla variabilidade entre os casos (0,15 a 5,11 anos), o que indica uma heterogeneidade significativa na evolução clínica, mesmo entre pacientes com genótipos considerados favoráveis. Em um estudo realizado no Vietnã, com 156 pacientes de diversos subtipos, o tempo mediano até a recaída foi de 29,3 meses (Tuong, Kiem Hao e Kim Hoa, 2020). Já em estudo com pacientes com a translocação t(12;21), esse tempo até

a primeira recaída foi de aproximadamente 26 meses (Martineau *et al.*, 2005). A diferença observada na presente coorte pode estar relacionada à inclusão de apenas subtipos genéticos de bom prognóstico, o que pode ter contribuído para um tempo mediano mais longo.

A taxa de mortalidade nesta coorte foi de 10,6%, valor inferior ao reportado em outros estudos, como o de Hosseini-Baharanchi *et al.* (2021), com 17,2% em uma coorte geral de LLA, e ao de Lustosa de Sousa *et al.* (2015), que apontou uma sobrevida global de 72% em cinco anos. A menor mortalidade pode estar relacionada ao perfil genético mais favorável das amostras. O maior número absoluto de óbitos foi observado no grupo com *ETV6::RUNX1*, que representou quase metade da coorte de óbitos, mas a taxa de mortalidade nesse subtipo foi relativamente baixa, semelhante à observada na alta hiperdiploidia, padrão observado por Lee *et al.* (2021). Já o grupo com t(1;19) apresentou mortalidade de 14,3%, compatível com achados de Asai *et al.* (2014). A maior proporção de óbitos (50%) foi registrada entre os pacientes com *ETV6::RUNX1* associada a aneuploidias concomitantes, embora esse dado deva ser interpretado com cautela devido ao número reduzido de casos (n = 6).

A mortalidade observada nesta coorte também reforça que, além dos fatores biológicos e da atividade da doença, as complicações infecciosas continuam sendo um desafio relevante no manejo clínico da LLA-B. Esse cenário é especialmente crítico em países em desenvolvimento, onde limitações estruturais, contribuem para taxas mais elevadas de morbimortalidade infecciosa. Ainda que a obtenção da remissão seja um marco terapêutico importante, ela não assegura um bom desfecho clínico sem um suporte adequado frente à toxicidade do tratamento e à imunossupressão prolongada (Caniza *et al.*, 2015).

Observou-se uma associação significativa (p = 0,024) entre o protocolo terapêutico utilizado e a ocorrência de recaídas, com taxas de recaída mais elevadas nos protocolos mais antigos e substancial redução nos mais recentes. Esse padrão pode ser justificado pela evolução dos protocolos, que têm incorporado práticas mais eficazes, como a estratificação de risco baseada em marcadores genéticos e resposta ao tratamento (DRM), além da introdução de esquemas mais individualizados e intensificação terapêutica em casos de maior risco (Tito Rodriguez *et al.*, 2024). É importante considerar também que o número de pacientes tratados com os protocolos mais novos é pequeno e o tempo de acompanhamento pode ser curto para detectar recaídas tardias, apesar de termos delimitado o estudo para diagnósticos até 2022 para podermos ter pelo menos dois anos

de acompanhamento desses pacientes. A elevada taxa de recaída no grupo que utilizou múltiplos protocolos (50%) pode refletir casos com resposta inicial desfavorável ou maior complexidade clínica, demandando ajustes terapêuticos ao longo do tratamento.

A avaliação da resposta ao tratamento nesta coorte foi influenciada tanto pela diversidade de protocolos terapêuticos adotados ao longo do tempo quanto pela evolução das ferramentas diagnósticas disponíveis. Inicialmente, essa avaliação era realizada exclusivamente por mielograma, um método de menor sensibilidade. A partir de 2018, passou-se a utilizar a detecção de doença residual mínima (DRM) por citometria de fluxo, técnica mais sensível e precisa, que permitiu uma estratificação mais refinada dos pacientes. Essa heterogeneidade metodológica dificultou comparações diretas entre todos os grupos, restringindo análises mais detalhadas aos subgrupos genéticos com pelo menos três pacientes e dados de DRM disponíveis em um ou mais momentos do tratamento. Ainda assim, a avaliação da resposta por meio da DRM possibilitou a identificação de padrões consistentes entre diferentes subtipos genéticos, especialmente entre pacientes tratados com os protocolos GBTLI93 e BFM2009.

Os dados de resposta precoce ao tratamento indicaram padrão favorável nos subgrupos analisados. No protocolo GBTLI93, os pacientes com *ETV6::RUNX1*, alta hiperdiploidia e apresentaram boa resposta inicial, com medula hipocelular e baixos percentuais de blastos já no D15, padrão mantido ou melhorado no D33. Apesar da menor sensibilidade do mielograma e do número reduzido de casos avaliados em alguns subgrupos, esses achados sugerem eficácia inicial adequada.

De forma semelhante, no protocolo BFM2009, que utilizou citometria de fluxo para detecção de doença residual mínima (DRM), observou-se negatificação progressiva nos subgrupos com *ETV6::RUNX1* e alta hiperdiploidia, com a maioria dos pacientes atingindo DRM indetectável até o D78. No subtipo t(1;19), embora a resposta tenha sido mais heterogênea nos primeiros dias, todos os pacientes alcançaram DRM negativa até o D78, indicando boa resposta terapêutica mesmo em subgrupos de menor frequência na coorte.

A avaliação da doença residual mínima (DRM) é um dos pilares da estratificação terapêutica na LLA-B pediátrica e sua negatificação precoce, especialmente durante a indução da remissão, permite o ajuste de doses do tratamento em subgrupos de baixo risco (Pui, 2020).

Os achados desta coorte corroboram o perfil geralmente favorável de resposta ao tratamento observado nesses subgrupos, com negatificação progressiva da doença residual

mínima ao longo da indução. No entanto, a resposta à terapia varia entre os subtipos e, mesmo entre os considerados de bom prognóstico. Segundo a literatura, pacientes com a fusão *TCF3::PBX1*, por exemplo, tendem a apresentar uma resposta rápida à quimioterapia, com negatificação precoce da DRM (Xue *et al.*, 2021).

Com essas lacunas a esclarecer, estudos recentes têm identificado perfis genéticos específicos que influenciam a resposta ao tratamento dentro dos mesmos subgrupos moleculares, reforçando a importância da estratificação dos pacientes e da adoção de abordagens terapêuticas cada vez mais personalizadas (Lee, Yang, *et al.*, 2023; Purvis *et al.*, 2025).

6.2 Análises genético-moleculares

A análise de componentes principais (PCA), baseada nos genes comuns entre os dois painéis utilizados (customizado e comercial), demonstrou que as amostras mantiveram um padrão de agrupamento coerente com os subtipos genéticos previamente estabelecidos ao diagnóstico. Esse resultado reforça a estabilidade dos perfis transcricionais característicos de cada subtipo, já descrita em estudos anteriores (Beder *et al.*, 2023), e sugere que a combinação de dados oriundos de plataformas distintas pode ser viável, desde que haja uma sobreposição adequada de regiões analisadas e uma normalização criteriosa. Essa abordagem está alinhada com diretrizes metodológicas da literatura, que recomendam avaliar a qualidade do agrupamento e interpretar seus significados biológicos como parte da validação do uso integrado de painéis distintos (Lingen, Suarez-Diez e Saccenti, 2024).

Apesar da boa separação entre os subgrupos moleculares na PCA, algumas amostras apresentaram posicionamento fora dos agrupamentos principais. A amostra 969.1, por exemplo, foi inicialmente classificada como hiperdiploide, mas a fusão *ETV6::RUNX1* foi identificada com a utilização do pipeline de fusões, o que justifica sua proximidade ao cluster *ETV6::RUNX1*. Já a amostra 858.1, de um paciente com fusão *ETV6::RUNX1* previamente conhecida e cariótipo hiperdiploide (56 cromossomos), posicionou-se entre os dois grupos, refletindo características de ambos. A amostra 494.1, pertencente ao grupo *ETV6::RUNX1* e sem outras alterações detectadas no cariótipo, apresentou um padrão de expressão diferente do restante de seu subgrupo, sem explicação evidente com base nos dados disponíveis. No entanto, esse comportamento pode estar relacionado à heterogeneidade clonal descrita na LLA-B, que pode resultar em perfis

transcricionais divergentes mesmo dentro de um mesmo subtipo (Ratti *et al.*, 2020). Embora essa clusterização atípica para essas amostras possa refletir a complexidade genética da doença, de acordo com suas últimas avaliações registradas em prontuários, os pacientes mencionados encontram-se atualmente em remissão. Esse resultado reforça a complexidade da relação entre alterações genéticas e evolução clínica na LLA-B.

A análise de expressão diferencial das amostras classificadas como *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1* e alta hiperdiploidia demonstrou que o painel customizado de RNA foi capaz de discriminar adequadamente os principais subtipos moleculares de LLA-B. A clusterização com base nos genes do painel resultou em agrupamentos consistentes com a classificação molecular, refletindo os perfis transcricionais característicos desses subgrupos descritos na literatura (Beder *et al.*, 2023). Esses resultados validam a aplicabilidade do painel como uma ferramenta direcionada e eficaz para investigação molecular em LLA-B.

Embora o RNA-seq seja altamente eficaz na detecção de fusões e expressão gênicas, sua aplicação é restrita ao que está sendo transcrito. Alterações presentes no DNA, mas que não resultam em transcrição ativa, não são capturadas. Além disso, a instabilidade do RNA, sua suscetibilidade à degradação, e a presença de modificações pós-transcricionais podem impactar a qualidade e a representatividade dos dados (Ku *et al.*, 2012). Esses fatores limitam a capacidade do RNA-seq de fornecer um panorama completo das alterações moleculares associadas à recaída, ressaltando a importância de abordagens complementares, como o sequenciamento de DNA e MLPA.

6.2.1 Expressão gênica diferencial por subgrupo molecular

Para investigar as alterações moleculares associadas à recaída na LLA-B, comparamos os perfis de expressão gênica entre as amostras de pacientes que recaíram nos momentos de diagnóstico e recaída e, também, entre amostras de diagnóstico dos mesmos subtipos de pacientes que entraram em remissão ou que evoluíram para recaída. Essa abordagem permite identificar genes diferencialmente expressos que podem estar relacionados à mecanismos de progressão da doença ou resistência ao tratamento. Alguns dos subtipos apresentaram um número elevado de genes diferencialmente expressos, no entanto, priorizamos genes com maior relevância pré-estabelecida na literatura ou que se mostraram mais discriminatórios entre os momentos clínicos. Muitos dos genes identificados estão envolvidos em vias clássicas do câncer, como sinalização PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT, MAPK e controle do ciclo celular, o que é esperado

considerando o foco dos painéis em genes relacionados à oncogênese e progressão tumoral. No entanto, seus papéis específicos na LLA-B, particularmente no contexto de recaídas, ainda requerem investigação mais aprofundada para elucidar potenciais implicações biológicas e terapêuticas.

6.2.1.1 Subtipo *ETV6::RUNXI*

Na nossa coorte de pacientes *ETV6::RUNXI*, apenas o gene *ZBTB16* apresentou diferença estatisticamente significativa de expressão entre diagnóstico e recaída, sendo mais expresso nas amostras do momento de diagnóstico. Embora não haja relatos prévios que associem diretamente *ZBTB16* à LLA-B, seu papel como supressor tumoral está bem descrito em outros contextos. Em condições normais, *ZBTB16* (também conhecido como *PLZF*) atua inibindo a proliferação celular e induzindo apoptose, através da regulação positiva de genes como *ZBTB28* e da antagonização de *BCL6*, como descrito em câncer de mama (He et al., 2020). Em câncer de próstata, sua hipoexpressão foi relacionada à progressão para formas mais agressivas e resistentes ao tratamento (Stopsack et al., 2019). O achado de menor expressão de *ZBTB16* em nossas amostras de recaída pode sugerir que esse gene desempenhe função análoga na LLA-B *ETV6::RUNXI*, potencialmente desempenhando um papel na sobrevivência ou na resistência do clone leucêmico.

O estudo de Mao et al., (2017) evidencia que a expressão de *ZBTB16* em linhagens linfoides é regulada por um elemento potencializador específico, cuja ativação depende da atuação do fator de transcrição *RUNXI*. Considerando que *RUNXI* está envolvido diretamente na fusão *ETV6::RUNXI*, resultante da translocação t(12;21), é plausível que alterações funcionais relacionadas a essa via possam impactar a regulação de *ZBTB16* nesse grupo de pacientes.

Assim, a hipoexpressão de *ZBTB16* observada nas amostras de recaída pode refletir não apenas uma perda de sua função supressora, mas também disfunções regulatórias decorrentes da própria fusão *ETV6::RUNXI*, afetando o equilíbrio de vias transcricionais associadas. Isso reforça a necessidade de estudos adicionais para investigar o papel funcional de *ZBTB16* na LLA-B *ETV6::RUNXI*.

Na comparação entre pacientes *ETV6::RUNXI* recaídos e em remissão, não foram identificados genes diferencialmente expressos com significância estatística. Esse achado pode refletir a ausência, nos painéis utilizados, de genes previamente associados à recaída nesse subtipo, além de limitações inerentes à análise por RNA-seq.

6.2.1.2 Subtipo *TCF3::PBX1*

A análise pareada entre diagnóstico e recaída em pacientes com fusão *TCF3::PBX1* revelou 35 genes diferencialmente expressos, evidenciando a heterogeneidade e a dinâmica evolutiva da leucemia nesse subtipo. Observou-se uma tendência geral de redução na expressão de vários genes associados à proliferação celular, regulação epigenética e manutenção do microambiente medular, incluindo *SETBP1*, *RRM1*, *BCOR*, *FGFR2* e *BCL9* (Astolfi *et al.*, 2019; Mani *et al.*, 2023; Metro *et al.*, 2009; Ono *et al.*, 2023; Sugimoto *et al.*, 2016; Terada *et al.*, 2018; Whitlock *et al.*, 2024). Tais alterações sugerem que a doença evolui para um estado com características adaptativas, potencialmente refletindo a seleção de subclones mais resistentes e menos dependentes dos mecanismos proliferativos clássicos.

Por outro lado, alguns genes relacionados à sinalização celular e resistência terapêutica, como *IKZF1*, *CRLF2*, *EPOR*, *JAK2*, *STAT5B*, *BCL6* e *MYC1*, apresentaram expressão aumentada na recaída em relação ao diagnóstico, indicando a ativação de vias que podem favorecer a sobrevivência clonal e o escape à quimioterapia (Allen *et al.*, 2014; Asai *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012; Downes *et al.*, 2022; Gao *et al.*, 2022; Iacobucci *et al.*, 2016; Iacobucci e Mullighan, 2017; McLachlan *et al.*, 2022; Wang e Bunting, 2016). Essa modulação da expressão gênica pode indicar uma adaptação da leucemia frente à pressão terapêutica, envolvendo alterações na regulação transcricional, sinalização por citocinas e controle do ciclo celular.

A diminuição da expressão de genes ligados à estabilidade genômica como o *FUS* (Hicks *et al.*, 2000) e à regulação da diferenciação, como *BACH2* e *CEBPE* reforça a ideia de que a evolução da doença está marcada por um desequilíbrio na manutenção da integridade celular e na capacidade de resposta ao dano, facilitando a emergência de subclones mais agressivos e resistentes à terapia (Aref *et al.*, 2023; Ge *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

Na análise entre os pacientes com fusão *TCF3::PBX1*, o gene *WT1* foi o único diferencialmente expresso no diagnóstico ao comparar os pacientes em remissão e os que recaíram, apresentando-se mais expresso naqueles que evoluíram para recaída. *WT1* é um fator de transcrição conhecido por seu papel ambíguo na leucemogênese, atuando como oncogene ou supressor tumoral dependendo do contexto molecular (Niktoreh *et al.*, 2023).

Embora o número limitado de amostras restrinja conclusões definitivas, esse achado corrobora a literatura que associa a superexpressão de *WT1* a um prognóstico desfavorável na LLA-B, especialmente no grupo B-other. A maior expressão desse gene tem sido relacionada a características clínicas mais agressivas, maior carga de doença residual mínima e pior sobrevida global e livre de eventos, mesmo entre pacientes classificados como risco padrão por outros critérios (Xue *et al.*, 2023).

Importante destacar que esta análise foi restrita entre amostras do subtipo *TCF3::PBX1*, limitando a extrapolação dos resultados para a LLA-B como um todo. Além disso, a ausência de determinados genes tradicionalmente associados à recaída nos painéis utilizados pode ter restringido a identificação de biomarcadores adicionais. Portanto, estes resultados evidenciam a complexidade biológica da recaída e reforçam a necessidade de estudos funcionais complementares, que possam contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

6.2.1.3 Subtipo Alta Hiperdiploidia

Na análise do subtipo de alta hiperdiploidia, foram identificados 14 genes com expressão diferencial significativa entre diagnóstico e recaída, evidenciando a heterogeneidade biológica e a complexidade da evolução clonal nesses casos (Aertgeerts *et al.*, 2023; Ramos-Muntada *et al.*, 2022). Apesar da clusterização não ter sido totalmente conclusiva, o perfil observou tendências funcionais claras que sugerem mecanismos adaptativos da leucemia frente ao tratamento.

Genes relacionados à proliferação celular, bloqueio da diferenciação e resistência à apoptose, como *HOXA9*, *HOXA10*, *CEBPA*, *FGFR3* e *RET*, apresentaram expressão aumentada nas recaídas, podendo indicar a reativação de vias pró-leucêmicas conhecidas por seu papel em processos de agressividade e progressão tumoral. A via *HOXA*, amplamente estudada em leucemias mieloides, pode contribuir para a manutenção e expansão de clones agressivos (Collins e Hess, 2016; Guo *et al.*, 2020), enquanto a superexpressão de *CEBPA* e receptores de sinalização como *FGFR3* e *RET* sugere ativação de mecanismos que favorecem a resistência terapêutica (Desilets *et al.*, 2023; Jerchel *et al.*, 2019; Szmajda *et al.*, 2019).

.Além disso, fatores de regulação transcricional como *BCL6*, *GATA1*, *TAL1* e *ELL* mostraram alterações que podem estar associadas ao reprogramação do microambiente e

à desregulação da diferenciação linfóide, indicando a possível participação de múltiplas vias na adaptação clonal e persistência da doença

Apesar da limitação na separação clara dos grupos das amostras de diagnóstico de pacientes recaídos e não recaídos pela análise de clusterização, foi possível observar que, em todos os casos de recaída no subtipo de alta hiperdiploidia, os genes *RUNX1*, *CCND2*, *CDK6* e *BCL2* apresentaram expressão consistentemente reduzida. Esse padrão pode sugerir que a menor expressão desses genes no momento inicial pode estar associada a um risco aumentado de recaída nesse grupo.

O *CCND2*, que também apresentou baixa expressão nas amostras de diagnóstico dos pacientes que recaíram, mostrou comportamento semelhante em outros subgrupos, como no *TCF3::PBX1*, quando comparadas as amostras pareadas de diagnóstico e recaída. Essa recorrência reforça a hipótese de que a hipoexpressão de *CCND2* possa estar relacionada a um fenótipo celular mais resistente e à regulação da resposta terapêutica, embora seu impacto funcional ainda demande investigação mais aprofundada (Zhang, H. et al., 2014; Zhang et al., 2022).

O *CDK6*, quinase dependente de ciclina D envolvida na progressão do ciclo celular, também apresentou expressão reduzida. Apesar de frequentemente superexpresso em outras neoplasias, sua função pode variar conforme o contexto celular e tipo tumoral (Tadesse et al., 2015).

O gene *BCL2*, conhecido por sua função antiapoptótica, apresentou expressão diminuída nas amostras diagnósticas dos pacientes que recaíram. Estudos indicam que níveis elevados de *BCL2* estão associados a melhor resposta terapêutica e maior sobrevida em LLA pediátrica, além de características clínicas favoráveis, como menor contagem leucocitária (Mata et al., 2010; Stamati et al., 2015). Portanto, sua hipoexpressão pode refletir um perfil de maior risco, embora seu valor prognóstico isolado ainda seja controverso.

Por fim, o fator de transcrição *RUNX1*, amplamente relacionado à leucemogênese e conhecido por suas fusões gênicas no subtipo *ETV6::RUNX1*, apresentou expressão reduzida nas amostras de diagnóstico dos pacientes que recaíram. Embora seu papel funcional isolado na LLA-B seja pouco explorado, alterações em *RUNX1* são reconhecidas em diversas neoplasias hematológicas, sugerindo potencial relevância biológica que precisa ser melhor investigada (Sood, Kamikubo e Liu, 2017).

De forma geral, embora os padrões de expressão gênica observados sugiram possíveis marcadores associados à recaída em subgrupos específicos da LLA-B, essas

observações devem ser interpretadas com cautela devido ao número amostral reduzido e à disponibilidade limitada de amostras pareadas de diagnóstico e recaída, o que impõe limitações às análises estatísticas.

Além disso, embora as alterações identificadas não apresentem muitos pontos em comum entre os subgrupos, fica evidente que ocorre uma mudança significativa no comportamento molecular da doença tanto entre diagnóstico e recaída quanto entre pacientes que recaíram e aqueles que permaneceram em remissão. Essas variações refletem a complexidade e heterogeneidade biológica da LLA-B, indicando que diferentes mecanismos podem estar envolvidos na evolução e resistência da doença conforme o subtipo. O impacto clínico e funcional dessas alterações ainda precisa ser elucidado, ressaltando a importância de estudos futuros que integrem análises genômicas, de expressão gênica e funcionais para aprofundar a compreensão dos processos que sustentam a recaída e aprimorar estratégias terapêuticas personalizadas.

6.2.2 Co ocorrência de alterações moleculares

Na análise das alterações genéticas das amostras de recaída, não foi revelado um padrão único ou amplamente recorrente de alterações genéticas, mas foi possível identificar eventos moleculares comumente descritos na literatura como associados a um pior prognóstico.

Dentre os achados no subgrupo de alta hiperdiploidia, destacam-se duplicações da região pseudo-autossomal (PAR1), variantes patogênicas em *CREBBP*, deleções nos genes *IKZF1*, *PAX5* e *CDKN2A/B*, além de ganhos do cromossomo 21, detectados por MLPA. Essas alterações, já descritas na literatura em associação com recaídas e desfechos desfavoráveis, indicam que, mesmo em subtipos considerados de bom prognóstico, podem ocorrer eventos genéticos relevantes do ponto de vista biológico e clínico (Feng *et al.*, 2022; Garcia-Gimenez *et al.*, 2025; Jia e Gu, 2022; Mullighan *et al.*, 2009; Russell *et al.*, 2009; Steeghs *et al.*, 2019). A presença dessas lesões pode refletir ainda mecanismos de resistência adquirida, reforçando a importância de abordagens mais refinadas e personalizadas para estratificação de risco.

Nos casos com *ETV6::RUNX1*, foram observadas alterações adicionais em genes associados à regulação da diferenciação linfóide e manutenção da estabilidade genômica. Dois pacientes apresentaram deleções em *PAX5*, achado frequentemente descrito como cooperante na leucemogênese do subtipo *ETV6::RUNX1* (Weyden, van der *et al.*, 2015). Além disso, foram identificadas deleções na região PAR1, que compreende genes

envolvidos na sinalização celular e regulação da proliferação e podem indicar alterações em genes como *CRLF2*, que contribui para um pior curso da doença em outros subtipos (Chen *et al.*, 2012).

Um dos casos de recaída apresentou ainda uma fusão *RUNX1::CTCI*, cuja relevância funcional ainda não é bem estabelecida, mas sabe-se que alterações adicionais em *RUNX1* podem contribuir negativamente para a progressão da doença (Jakobczyk *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2021; Sood, Kamikubo e Liu, 2017).

Nos cinco casos de com *TCF3::PBX1*, não foram identificadas alterações adicionais pelas metodologias aplicadas, além da própria fusão *TCF3::PBX1*. Embora diversas variantes de significado incerto (VUS) tenham sido detectadas em todos os subgrupos analisados, as limitações inerentes às análises de variantes a nível de RNA, impedem conclusões definitivas quanto à veracidade e relevância biológica desses achados.

A análise conjunta da classificação de risco e das alterações genético-moleculares evidenciou padrões distintos entre os subgrupos que recaíram, com predominância de pacientes inicialmente classificados como baixo ou intermediário risco nos subgrupos de alta hiperdiploidia e *ETV6::RUNX1*, e alto risco no *TCF3::PBX1*. Embora as alterações genéticas primárias desses subgrupos estejam bem caracterizadas, a presença de alterações secundárias, como deleções em *IKZF1*, *PAX5*, *CDKN2A/B* e variantes pontuais detectadas por NGS, reforça a importância de ampliar a investigação molecular além dos marcadores tradicionais. Um exemplo é o paciente BM 1242, inicialmente classificado como baixo risco, mas reclassificado para alto risco durante o tratamento devido à má resposta nas avaliações de DRM. É possível que alterações secundárias de alto impacto, como deleções em *IKZF1* e *CDKN2A/B*, tenham contribuído para essa resposta desfavorável. Alterações secundárias têm sido associadas a maior resistência terapêutica e risco aumentado de recaída, sugerindo que a estratificação baseada apenas nas alterações primárias pode subestimar o real risco biológico dos pacientes (Abdelfattah *et al.*, 2025; Ampatzidou *et al.*, 2023; Enshaei *et al.*, 2021; Lejman *et al.*, 2022).

6.3 Microambiente tumoral

A coorte de pacientes que teve o microambiente medular analisado apresentou distribuição genética e de risco semelhante à da coorte total, com predomínio do subtipo t(12;21) e classificação de risco baixo a intermediário. Diferente da coorte geral, dentre

os 43 pacientes houve um leve predomínio do sexo feminino (53,49%). A maioria dos pacientes não apresentou recaída e mantinha-se viva ao final do acompanhamento, refletindo o bom prognóstico esperado para esse grupo de pacientes.

A análise do microambiente medular por citometria de fluxo utilizando o painel EuroFlow permitiu a identificação das subpopulações estromais, mesenquimais e endoteliais em 43 pacientes com LLA-B de bom prognóstico.

A partir da análise por curva ROC para valores da proporção de células endoteliais e mesenquimais nos diferentes pontos de tratamento (D15, D33 e D78), foi estabelecido um ponto de corte de 14,15% para células endoteliais no 33º dia pós início de tratamento. Os achados referentes ao ponto de corte para a proporção de células endoteliais no microambiente medular diferem do estudo de Oliveira et al., (2022), no qual foi identificado um valor superior a 32% de células endoteliais no compartimento de estromais no 78º dia de tratamento como parâmetro relevante para associação com mau prognóstico. Essas diferenças podem estar relacionadas ao fato de que nossa amostra foi composta exclusivamente por pacientes com LLA-B de bom prognóstico, enquanto o estudo de referência avaliou uma população maior e mais heterogênea, sem seleção baseada no perfil molecular. Além disso, as diferenças nos protocolos terapêuticos aplicados nas duas coortes podem ter influenciado os resultados.

Considerando pacientes com valores de endoteliais dentro do compartimento acima desse ponto de corte como alterados foi feita uma curva de Kaplan-Meier, afim de verificar a capacidade desse valor de corte de discriminar um pior curso da doença. Embora a estratificação dos pacientes com base nesse valor não tenha revelado significância estatística na análise de sobrevida livre de eventos ($p = 0,081$), a separação das curvas sugere possível relevância biológica da expansão endotelial, assim como visto no estudo de Oliveira et al., (2022).

Na presente coorte, dois dos três pacientes que evoluíram para recaída no grupo avaliado quanto ao microambiente tumoral apresentavam aumento na proporção de células endoteliais no D33, acima do ponto de corte de 14,15%, ambos pertencentes ao subgrupo com a fusão *ETV6::RUNX1*. Apesar do número reduzido de casos, esse achado levanta a hipótese de que alterações no microambiente tumoral possam interagir com características moleculares específicas, potencialmente influenciando a evolução clínica.

Por outro lado, a análise de expressão gênica baseada nos dados do microambiente não identificou genes diferencialmente expressos entre os grupos “normal” e “alterado”. Esse resultado pode estar relacionado tanto à limitação amostral quanto à complexidade

das interações entre as células leucêmicas e o nicho estromal. Assim, embora haja indícios de relevância biológica da proporção de células endoteliais, a confirmação do seu impacto prognóstico exige estudos adicionais com maior número de pacientes e avaliação em diferentes momentos do tratamento.

7 Conclusão

Este estudo caracterizou uma coorte pediátrica de leucemia linfóide aguda B de bom prognóstico, composta pelos subtipos *ETV6::RUNX1*, alta hiperdiploidia e *TCF3::PBX1*, cujo perfil clínico e genético mostrou-se consistente com a literatura, validando a representatividade da amostra. Apesar da associação clássica desses subgrupos a desfechos favoráveis, foram identificadas alterações genéticas secundárias, incluindo deleções em *IKZF1*, *PAX5*, *CDKN2A/B*, variantes patogênicas em *CREBBP* e alterações na região *PARI*, que podem influenciar a evolução clínica e a resistência terapêutica.

A análise comparativa de expressão gênica revelou diferenças tanto entre amostras pareadas de diagnóstico e recaída quanto entre amostras de diagnóstico de pacientes que permaneceram em remissão e daqueles que recaíram. Os genes diferencialmente expressos estão associados a vias proliferativas, metabólicas, imunes e de interação com o microambiente medular, sugerindo possíveis mecanismos moleculares envolvidos na progressão da doença. No entanto, a ausência de padrões recorrentes e a necessidade de validação funcional reforçam a complexidade do fenômeno.

No que se refere ao microambiente medular, observou-se uma tendência à associação entre maior proporção de células endoteliais no D33 e piores desfechos clínicos, bem como ausência de diferenças de expressão gênica entre amostras de microambientes classificados como “normal” ou “alterado”, possivelmente em razão do número reduzido de amostras. Esses achados reforçam o papel potencial de componentes estromais na manutenção da doença e na resposta terapêutica, ainda que mais estudos sejam necessários para confirmar essa relação.

De modo geral, os resultados obtidos reforçam a importância do monitoramento genético contínuo e do uso de abordagens integrativas que considerem tanto as alterações moleculares quanto o microambiente tumoral, com o intuito de aprimorar a estratificação de risco mesmo em pacientes classificados como de bom prognóstico.

Entre as limitações do estudo, destacam-se o número reduzido de pacientes, a heterogeneidade dos dados e o uso exclusivo de RNA-seq para a identificação de novas alterações, fatores que reforçam a necessidade de validação em coortes independentes e complementação com outras abordagens moleculares.

8 Perspectivas futuras

- Análise da expressão gênica de genes previamente relacionados ao prognóstico no subtipo *ETV6::RUNX1* que não estão presentes nos painéis utilizados, como *TBL1XR1* e *MIB1*.
- Avaliação dos pacientes com alta hiperdiploidia considerando novos parâmetros de ganhos cromossômicos e seu impacto prognóstico.
- Ampliação da análise da frequência de células estromais para todos os pacientes com LLA-B no período estudado, independentemente do subtipo molecular.

9 Referências

ABDELFATTAH, N. E. *et al.* Copy number alterations in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia patients and their association with patients' outcome. **Annals of Hematology**, v. 104, n. 3, p. 1821–1832, 26 mar. 2025.

AERTGEERTS, M. *et al.* Clonal Heterogeneity and Evolution during Treatment in High Hyperdiploid B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v. 142, n. Supplement 1, p. 1606–1606, 2 nov. 2023.

AHMAD, F. H.; AL-DOSKI, A. A. Minimal Residual Disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Advanced medical journal**, v. 9, n. 3, p. 108–115, 9 set. 2024.

AKHTAR, M. *et al.* Paget's "Seed and Soil" Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 26, n. 1, p. 69–74, jan. 2019.

AL-KZAYER, L. F. Y. *et al.* Comprehensive genetic analyses of childhood acute leukemia in Iraq using next-generation sequencing. **Translational Pediatrics**, v. 12, n. 5, p. 827–844, maio 2023.

ALLEN, A. *et al.* C-MYC protein expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia, prognostic significance? **Leukemia Research**, v. 38, n. 9, p. 1061–1066, set. 2014.

ALPAR, D. *et al.* Clonal origins of *ETV6-RUNX1* + acute lymphoblastic leukemia: Studies in monozygotic twins. **Leukemia**, v. 29, n. 4, p. 839–846, 15 abr. 2015.

AMPATZIDOU, M. *et al.* The Prognostic Effect of *CDKN2A/2B* Gene Deletions in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): Independent Prognostic Significance in BFM-Based Protocols. **Diagnostics**, v. 13, n. 9, p. 1589, 28 abr. 2023.

AREF, S. *et al.* Significance of *CEBPE* Gene Promoter Polymorphism (Rs2239630 G > A) Assessment in Childhood B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 45, n. 3, p. e334–e338, abr. 2023.

ASAI, D. *et al.* *IKZF1* deletion is associated with a poor outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Japan. **Cancer Medicine**, v. 2, n. 3, p. 412–419, 9 jun. 2013.

ASAI, D. *et al.* Outcome of TCF3-PBX1 positive pediatric acute lymphoblastic leukemia patients in Japan: a collaborative study of Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) and Children's Cancer and Leukemia Study Group (CCLSG). **Cancer medicine**, v. 3, n. 3, p. 623–631, 1 jun. 2014.

ASTOLFI, A. *et al.* BCOR Involvement in Cancer. **Epigenomics**, v. 11, n. 7, p. 835–855, 31 maio 2019.

AYOB, A. Z.; RAMASAMY, T. S. **Cancer stem cells as key drivers of tumour progression** *Journal of Biomedical Science* BioMed Central Ltd., , 6 mar. 2018.

BEDER, T. *et al.* The Gene Expression Classifier ALLCatchR Identifies B-cell Precursor ALL Subtypes and Underlying Developmental Trajectories Across Age. **HemaSphere**, v. 7, n. 9, p. e939, set. 2023.

BENNETT, J. M. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. **British Journal of Haematology**, v. 33, n. 4, p. 451–458, 12 ago. 1976.

CAMARGO, B. D. *et al.* Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: First report of 14 population-based cancer registries. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 715–720, 1 fev. 2010.

CANIZA, M. A. *et al.* Infectious complications in children with acute lymphoblastic leukemia treated in low-middle-income countries. **Expert Review of Hematology**, v. 8, n. 5, p. 627–645, 3 set. 2015.

CARROLL, A. J. *et al.* Masked hypodiploidy: Hypodiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) mimicking hyperdiploid ALL in children: A report from the Children's Oncology Group. **Cancer Genetics**, v. 238, p. 62–68, 1 out. 2019.

CHEN, I.M. *et al.* Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. **Blood**, v. 119, n. 15, p. 3512–22, 12 abr. 2012.

CHOUVARINE, P. *et al.* Transcriptional and mutational profiling of b-other acute lymphoblastic leukemia for improved diagnostics. **Cancers**, v. 13, n. 22, 1 nov. 2021.

COLLINS, C. T.; HESS, J. L. Role of HOXA9 in leukemia: Dysregulation, cofactors and essential targets. **Oncogene**, v. 35, n. 9, p. 1090-1098. 3 mar. 2016. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.174>

CONANT, J. L.; CZUCHLEWSKI, D. R. *BCR-ABL1*-like B-lymphoblastic leukemia/lymphoma: Review of the entity and detection methodologies. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 41, n. S1, p. 126–130, 8 maio 2019.

CONFORTI, A. *et al.* Biological, functional and genetic characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from pediatric patients affected by acute lymphoblastic leukemia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 7 nov. 2013.

CONTRERAS YAMETTI, G. P. *et al.* Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Current Practice and Future Directions. **Cancers**, v. 13, n. 8, p. 1847, 13 abr. 2021.

DAVIS, A. S.; VIERA, A. J.; MEAD, M. D. Leukemia: an overview for primary care. **American family physician**, v. 89, n. 9, p. 731–8, 1 maio 2014.

DELAHAYE, M. C. *et al.* Toward Therapeutic Targeting of Bone Marrow Leukemic Niche Protective Signals in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 8 jan. 2021.

DOWNES, C. E. *et al.* JAK2 Alterations in Acute Lymphoblastic Leukemia: Molecular Insights for Superior Precision Medicine Strategies. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 12 jul. 2022.

DWORZAK, M. N.; PANZER-GRÜMAYER, E. R. Flow Cytometric Detection of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v. 44, n. 9, p. 1445–1455, 6 jan. 2003.

EBBEN, J. D. *et al.* The cancer stem cell paradigm: A new understanding of tumor development and treatment. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 14, n. 6, p. 621-632. jun. 2010. <https://doi.org/10.1517/14712598.2010.485186>

ENSHA EI, A. *et al.* Defining low-risk high hyperdiploidy in patients with paediatric acute lymphoblastic leukaemia: a retrospective analysis of data from the UKALL97/99

and UKALL2003 clinical trials. **The Lancet Haematology**, v. 8, n. 11, p. e828–e839, 1 nov. 2021.

FALLATI, A., *et al.* Mesenchymal Stromal Cells (MSCs): An Ally of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) Cells in Disease Maintenance and Progression within the Bone Marrow Hematopoietic Niche. **Cancers**, v. 14, n. 14, 3303. 6 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14143303>

FELICE, M. S. *et al.* Prognostic impact of t(1;19)/ *TCF3-PBX1* in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of Berlin-Frankfurt-Münster-based protocols. **Leukemia and Lymphoma**, v. 52, n. 7, p. 1215–1221, jul. 2011.

FELICIANO, S. V. M.; SANTOS, M. DE O.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. Incidência e Mortalidade por Câncer entre Crianças e Adolescentes: uma Revisão Narrativa. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 64, n. 3, p. 389–396, 15 fev. 2019.

FENG, J.; GUO, Y.; YANG, W.; ZOU, Y.; ZHANG, L.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.; ZHU, X.; CHEN, X. Childhood Acute B-Lineage Lymphoblastic Leukemia With *CDKN2A/B* Deletion Is a Distinct Entity With Adverse Genetic Features and Poor Clinical Outcomes. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 24 maio 2022.

FEUSIER, J. *et al.* Genomic microarray analysis reveals heterogeneity in high hyperdiploid B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genetics**, v. 278–279, p. 12, nov. 2023.

FIDLER, I. J. The organ microenvironment and cancer metastasis. **Differentiation**, v. 70, n. 9–10, p. 498–505, dez. 2002.

FORD, A. M. *et al.* Origins of “late” relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with *TEL-AML1* fusion genes. **Blood**, v. 98, n. 3, p. 558-564, 2001. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.3.558>

GAO, L. *et al.* *MYC* Expression Is Associated With *p53* Expression and *TP53* Aberration and Predicts Poor Overall Survival in Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 157, n. 1, p. 119–129, 6 jan. 2022.

GARCIA-GIMENEZ, A. *et al.* *CREBBP* inactivation sensitizes B cell acute lymphoblastic leukemia to ferroptotic cell death upon *BCL2* inhibition. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 4274, 20 maio 2025.

GE, Z. *et al.* Ikaros regulation of the BCL6/BACH2 axis and its clinical relevance in acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8022–8034, 31 jan. 2017.

GHAZAVI, F. *et al.* Molecular basis and clinical significance of genetic aberrations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Experimental Hematology**, v. 43, n. 8, p. 640-653. 1 ago. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.05.015>

GÓRECKI, M. *et al.* Updates in *KMT2A* Gene Rearrangement in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Biomedicines**, v. 11, n. 3, p. 821, 8 mar. 2023.

GOULDEN, N.; OAKHILL, A.; STEWARD, C. Practical application of minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 112, n. 2, p. 275–281, 20 fev. 2001.

GROENEVELD-KRENTZ, S. *et al.* Aneuploidy in children with relapsed B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: clinical importance of detecting a hypodiploid origin of relapse. **British Journal of Haematology**, v. 185, n. 2, p. 266–283, 3 abr. 2019.

GU, Z. *et al.* PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. **Nature Genetics**, v. 51, n. 2, p. 296–307, 14 fev. 2019.

HAAS, O. A.; BORKHARDT, A. Hyperdiploidy: the longest known, most prevalent, and most enigmatic form of acute lymphoblastic leukemia in children. **Leukemia**, v. 36, n. 12, p. 2769-2783, 1 dez. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01720-z>

HARRIS, M. *et al.* Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 79, n. 12, p. 3316–3324, 15 jun. 1992.

HARRISON, C. J. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 122, n. 2, p. 147-156, jan. 2009.

HE, J. *et al.*, (2020). BTB/POZ zinc finger protein ZBTB16 inhibits breast cancer proliferation and metastasis through upregulating ZBTB28 and antagonizing BCL6/ZBTB27. **Clinical Epigenetics**, v. 12, n. 1, p. 82, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00867-9>

HEEREMA, N. A. *et al.* Prognostic Impact of Trisomies of Chromosomes 10, 17, and 5 Among Children With Acute Lymphoblastic Leukemia and High Hyperdiploidy (> 50 Chromosomes). **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 9, p. 1876–1887, 9 maio 2000.

HEIN, D. *et al.* The preleukemic TCF3-PBX1 gene fusion can be generated in utero and is present in ≈0.6% of healthy newborns. **Blood**, v. 134, n. 16, p. 1355–1358, 17 out. 2019.

HICKS, G. G. *et al.* Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. **Nature Genetics**, v. 24, n. 2, p. 175–179, fev. 2000.

HOSSEINI-BAHARANCHI, F. S. *et al.* Relapse, Mortality, and the Associated Factors in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia; A Competing Risks Analysis. **International Journal of Cancer Management**, v. 14, n. 5, 14 jun. 2021.

HUANG, F. L.; LIAO, E. C.; LI, C. L.; YEN, C. Y.; YU, S. J. Pathogenesis of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: Molecular pathways and disease treatments (Review). **Oncology Letters**, v. 20, n. 1, p. 448–454, 1 jul. 2020.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Redefining ALL classification: Toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. **Blood**, v. 125, n. 26, p. 3977–3987, 25 jun. 2015a.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541–1552, 15 out. 2015b.

IACOBUCCI, I. *et al.* Truncating Erythropoietin Receptor Rearrangements in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Cell**, v. 29, n. 2, p. 186–200, fev. 2016.

IACOBUCCI, I.; MULLIGHAN, C. G. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology** American Society of Clinical Oncology, v. 35, n. 9, p. 975-983, 20 mar. 2017.

INABA, H. *et al.* Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2025, NCCN Clinical Practice Guidelines In Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 23, n. 2, p. 41–62, fev. 2025.

INABA, H.; PUI, C. H. Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 9, 1 maio 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 9 abr. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 9 abr. 2025.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Haematolymphoid tumours [Internet]. *Em*: **WHO Classification of Tumours**. 5. ed. Lyon (France): IARC, 2024. v. 11.

JAKOBCZYK, H. *et al.* *ETV6-RUNX1* and *RUNX1* directly regulate *RAG1* expression: one more step in the understanding of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia leukemogenesis. **Leukemia**, v. 36, n. 2, p. 549–554, 17 fev. 2022.

JEHA, S. *et al.* Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. **Leukemia**, v. 23, n. 8, p. 1406–1409, 2009.

JEPSEN, V. H. *et al.* H1-0 is a specific mediator of the repressive ETV6::RUNX1 transcriptional landscape in preleukemia and B cell acute lymphoblastic leukemia. *HemaSphere*, v. 9, n. 4, 2 abr. 2025. <https://doi.org/10.1002/hem3.70116>

JIA, Z.; GU, Z. PAX5 alterations in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 25 out. 2022.

KNEZ, V. M. *et al.* Heterogeneity of abnormal RUNX1 leading to clinicopathologic variations in childhood B-lymphoblastic leukemia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 144, n. 2, p. 305–314, 1 ago. 2015.

KU, C. S. *et al.* Exome versus transcriptome sequencing in identifying coding region variants. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 3, p. 241-251, abr. 2012. <https://doi.org/https://doi.org/10.1586/erm.12.10>

KULKARNI, B. *et al.* Exosomal miRNA in chemoresistance, immune evasion, metastasis and progression of cancer. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 10, p. 2058-2067, 1 out. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.06.010>

LEE, J. W. *et al.* Differing Outcomes of Patients with High Hyperdiploidy and *ETV6-RUNX1* Rearrangement in Korean Pediatric Precursor B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Research and Treatment**, v. 53, n. 2, p. 567–575, 15 abr. 2021.

LEE, J. W. *et al.* Outcome and Prognostic Factors for ETV6/RUNX1 Positive Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Treated at a Single Institution in Korea. **Cancer Research and Treatment**, v. 49, n. 2, p. 446–453, 15 abr. 2017.

LEE, S. H. R. *et al.* Pharmacotypes across the genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia and impact on treatment response. **Nature Medicine**, v. 29, n. 1, p. 170–179, 1 jan. 2023.

LEE, S. H. R. *et al.* Prognostic and Pharmacotypic Heterogeneity of Hyperdiploidy in Childhood ALL. **Journal of Clinical Oncology**, v. 41, n. 35, p. 5422–5432, 10 dez. 2023.

LEJMAN, M. *et al.* Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2755, 2 mar. 2022.

LI, K.; DU, Y.; WEI, D. Q.; ZHANG, F. *CEBPE* expression is an independent prognostic factor for acute myeloid leukemia. **Journal of Translational Medicine**, v. 17, n. 1, 4 jun. 2019.

LI, Y. *et al.* Germline *RUNX1* variation and predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 17, 1 set. 2021.

LIM, J. Y. S.. Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 120, n. 7, p. 955-962 1 abr. 2014.
<https://doi.org/10.1002/cncr.28531>

LINGEN, H. J. VAN; SUAREZ-DIEZ, M.; SACCENTI, E. Normalization of gene counts affects principal components-based exploratory analysis of RNA-sequencing data. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1867, n. 4, p. 195058, dez. 2024.

LIU, F. *et al.* Efficacy and prognostic factors of the chemotherapy regimen of CCLG-ALL-2008 on pediatric acute lymphoblastic leukemia with *ETV6-RUNX1* rearrangement. **Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi**, v. 41, n. 11, p. 896–902, 14 nov. 2020.

LUSTOSA DE SOUSA, D. W. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 37, n. 4, p. 223–229, jul. 2015.

MALARD, F.; MOHTY, M. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. Lancet Publishing Group, , 4 abr. 2020.

Malard, F., & Mohty, M. (2020). Acute lymphoblastic leukaemia. In *The Lancet* (Vol. 395, Issue 10230, pp. 1146–1162). Lancet Publishing Group.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1)

MALINOWSKA-OZDOWY, K. *et al.* KRAS and CREBBP mutations: A relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 29, n. 8, p. 1656–1667, 7 ago. 2015.

MALONEY, K.; MCGAVRAN, L.; MURPHY, J.; ODOM, L.; STORK, L.; WEI, Q.; HUNGER, S. TEL-AML1 fusion identifies a subset of children with standard risk acute lymphoblastic leukemia who have an excellent prognosis when treated with therapy that

includes a single delayed intensification. **Leukemia**, v. 13, n. 11, p. 1708–1712, 1 nov. 1999.

MANI, M. *et al.* **Data from BCL9 Promotes Tumor Progression by Conferring Enhanced Proliferative, Metastatic, and Angiogenic Properties to Cancer Cells**, 30 mar. 2023.

MAO, A.-P.; ISHIZUKA, I. E.; KASAL, D. N.; MANDAL, M.; BENDELAC, A. A shared Runx1-bound Zbtb16 enhancer directs innate and innate-like lymphoid lineage development. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 863, 16 out. 2017.

MARTINEAU, M.; JALALI, G. R.; BARBER, K. E.; BROADFIELD, Z. J.; CHEUNG, K. L.; LILLEYMAN, J.; MOORMAN, A. V.; RICHARDS, S.; ROBINSON, H. M.; ROSS, F.; HARRISON, C. J. ETV6/RUNX1 fusion at diagnosis and relapse: Some prognostic indications. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 43, n. 1, p. 54–71, maio 2005.

MATA, J. F. *et al.* Low mRNA expression of the apoptosis-related genes *CASP3*, *CASP8*, and *FAS* is associated with low induction treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Pediatric Blood & Cancer**, v. 55, n. 1, p. 100–107, 15 jul. 2010.

MCLACHLAN, T.; MATTHEWS, W. C.; JACKSON, E. R.; STAUDT, D. E.; DOUGLAS, A. M.; FINDLAY, I. J.; PERSSON, M. L.; DUCHATEL, R. J.; MANNAN, A.; GERMON, Z. P.; DUN, M. D. B-cell Lymphoma 6 (BCL6): From Master Regulator of Humoral Immunity to Oncogenic Driver in Pediatric Cancers. **Molecular Cancer Research**, v. 20, n. 12, p. 1711–1723, 2 dez. 2022.

MEHTONEN, J. *et al.* Single cell characterization of B-lymphoid differentiation and leukemic cell states during chemotherapy in ETV6-RUNX1-positive pediatric leukemia identifies drug-targetable transcription factor activities. **Genome Medicine**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2020.

MELLENTIN, J. D.; MURRE, C.; DONLON, T. A.; MCCAWE, P. S.; SMITH, S. D.; CARROLL, A. J.; MCDONALD, M. E.; BALTIMORE, D.; CLEARY, M. L. The Gene for Enhancer Binding Proteins E12/E47 Lies at the t(1;19) Breakpoint in Acute Leukemias. **Science**, v. 246, n. 4928, p. 379–382, 20 out. 1989.

METRO, G. *et al.* *In Situ* Protein Expression of RRM1, ERCC1, and BRCA1 in Metastatic Breast Cancer Patients Treated with Gemcitabine-Based Chemotherapy. **Cancer Investigation**, v. 28, n. 2, p. 172–180, 30 set. 2009.

MONTAÑO, A.; ORDOÑEZ, J. L.; ALONSO-PÉREZ, V.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, J.; SANTOS, S.; GONZÁLEZ, T.; BENITO, R.; GARCÍA-TUÑÓN, I.; HERNÁNDEZ-RIVAS, J. M. ETV6/RUNX1 Fusion Gene Abrogation Decreases the Oncogenicity of Tumour Cells in a Preclinical Model of Acute Lymphoblastic Leukaemia. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 215, 15 jan. 2020.

MOORMAN, A V *et al.* Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. **Lancet Oncol**, v. 11, p. 429–467, 2010.

MULLIGHAN, C. G. *et al.* Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 5, p. 470–80, 29 jan. 2009.

NIKTOREH, N. *et al.* Understanding WT1 Alterations and Expression Profiles in Hematological Malignancies. **Cancers**, v. 15, n. 13, p. 3491, 4 jul. 2023.

NIRMAL, A. K.; MISHRA, N. T. P.; MISHRA, S.; TALREJA, S.; FATIMA, B.; SRIVASTAVA, S.; NIGAM, C.; MISRA, S. Transforming Transcriptomics: The Impact of RNA Sequencing Technology. **Asian Journal of Medicine and Health**, v. 22, n. 10, p. 40–57, 30 set. 2024.

NORÉN-NYSTRÖM, U. *et al.* Genetic Subtypes and Outcome of Patients Aged 1 to 45 Years Old With Acute Lymphoblastic Leukemia in the NOPHO ALL2008 Trial. **HemaSphere**, v. 7, n. 5, p. e883, maio 2023.

OLIVEIRA, E. *et al.* Bone Marrow Stromal Cell Regeneration Profile in Treated B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Patients: Association with MRD Status and Patient Outcome. **Cancers**, v. 14, n. 13, 1 jul. 2022.

ONO, H. *et al.* RRM1 is mediated by histone acetylation through gemcitabine resistance and contributes to invasiveness and ECM remodeling in pancreatic cancer. **International Journal of Oncology**, v. 62, n. 4, p. 51, 2 mar. 2023.

ÖZTÜRK, A. P.; KOÇ, B.; ZÜLFİKAR, B. Acute Complications and Survival Analysis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A 15-year Experience. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 21, n. 1, p. e39–e47, jan. 2021.

PANG, L.; LIANG, Y.; PAN, J.; WANG, J. R.; CHAI, Y. H.; ZHAO, W. L. Clinical features and prognostic significance of TCF3-PBX1 fusion gene in chinese children with acute lymphoblastic leukemia by using a modified all-BFM-95 protocol. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 32, n. 3, p. 173–181, 3 abr. 2015.

PANUCIAK, K.; NOWICKA, E.; MASTALERCZYK, A.; ZAWITKOWSKA, J.; NIEDŹWIECKI, M.; LEJMAN, M. **Overview on Aneuploidy in Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia** *International Journal of Molecular Sciences* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 maio 2023.

PAULSSON, K. *et al.* The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. **Nature Genetics**, v. 47, n. 6, p. 672–676, 11 jun. 2015.

PAULSSON, K.; JOHANSSON, B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 48., n. 8, p. 637-660, ago. 2009.

PON, J. R.; MARRA, M. A. Driver and Passenger Mutations in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, n. 1, p. 25–50, 24 jan. 2015.

PUI, C. H. Precision medicine in acute lymphoblastic leukemia. **Frontiers of Medicine** Higher Education Press Limited Company, , 1 dez. 2020.

Pui, C.-H., Robison, L. L., & Look, A. T. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 1030–1043, mar. 2008.

PURVIS, K. *et al.* Outcomes in patients with *ETV6* :: *RUNX1* or high-hyperdiploid B-ALL treated in the St. Jude Total Therapy XV/XVI studies. **Blood**, v. 145, n. 2, p. 190–201, 9 jan. 2025.

QIU, K. Y. *et al.* Prognostic Value and Outcome for ETV6/RUNX1-Positive Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the South China Children's Leukemia Group. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 20 dez. 2021.

QUEIROZ, K. *et al.* Análise Da Frequência Das Fusões Gênicas Mais Recorrentes Na Leucemia Linfoblástica Aguda Entre Os Continentes Do Mundo. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 46, p. S386–S387, out. 2024.

RAHNEMOON, A. R. *ETV6/RUNX1* fusion gene and its active role. **Cancer Research and Cellular Therapeutics**, v. 5, n. 4, p. 01–05, 30 ago. 2021.

RAMOS-MUNTADA, M. *et al.* Clonal heterogeneity and rates of specific chromosome gains are risk predictors in childhood high-hyperdiploid B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Molecular Oncology**, v. 16, n. 16, p. 2899–2919, 19 ago. 2022.

RATTI, S. *et al.* B-ALL Complexity: Is Targeted Therapy Still A Valuable Approach for Pediatric Patients? **Cancers**, v. 12, n. 12, p. 3498, 24 nov. 2020.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, G. *et al.* Infection Exposure Promotes *ETV6-RUNX1* Precursor B-cell Leukemia via Impaired H3K4 Demethylases. **Cancer Research**, v. 77, n. 16, p. 4365–4377, 15 ago. 2017.

RUBNITZ, J. E. *et al.* Case-control study suggests a favorable impact of TEL rearrangement in patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia treated with antimetabolite-based therapy: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 89, n. 4, p. 1143–6, 15 fev. 1997.

RUSSELL, L. J. *et al.* Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2688–2698, 24 set. 2009.

SALIBA, A. N.; FOÀ, R. Minimal residual disease in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: Maximizing the clinical yield of testing. **American Journal of Hematology**, v. 98, n. 8, p. 1168–1170, 14 ago. 2023.

SCHEPERS, K.; CAMPBELL, T. B.; PASSEGUÉ, E. Normal and leukemic stem cell niches: Insights and therapeutic opportunities. **Cell Stem Cell**. v. 16, n. 3, p. 254–267, 5 mar. 2015.

SHAHRIARI, M. *et al.* Extramedullary manifestations in acute lymphoblastic leukemia in children: a systematic review and guideline-based approach of treatment. **American Journal of Blood Research**, v. 10, n.6, p. 360–374, 2020.

SHARATHKUMAR, A. *et al.* Children with hyperdiploid but not triple trisomy (+4,+10,+17) acute lymphoblastic leukemia have an increased incidence of extramedullary relapse on current therapies: A single institution experience. **American Journal of Hematology**, v. 83, n. 1, p. 34–40, 15 jan. 2008.

SHARMA, G. *et al.* RNA binding protein IGF2BP1 synergizes with ETV6-RUNX1 to drive oncogenic signaling in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 42, n. 1, p. 231, 5 set. 2023.

SHERVASHIDZE, M. A. *et al.* Minimal residual disease in B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Clinical significance on post-induction treatment. **Medical alphabet**, n. 26, p. 31–34, 23 nov. 2022.

SHURTLEFF, S. A. *et al.* TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. **Leukemia**, v. 9, n. 12, p. 1985–9, dez. 1995.

SIMIONI, C. *et al.* The Complexity of the Tumor Microenvironment and Its Role in Acute Lymphoblastic Leukemia: Implications for Therapies. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 5 maio 2021.

SOOD, R.; KAMIKUBO, Y.; LIU, P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. **Blood**, v. 129, n. 15, p. 2070–2082, 13 abr. 2017.

STAMATI, L. *et al.* Overexpression of BCL2 and BAX following BFM induction therapy predicts ch-ALL patients' poor response to treatment and short-term relapse. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 141, n. 11, p. 2023–2036, 16 nov. 2015.

STEEGHS, E. M. P. *et al.* Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4634, 15 mar. 2019.

STOPSACK, K. H. *et al.* Low Expression of the Androgen-Induced Tumor Suppressor Gene *PLZF* and Lethal Prostate Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 28, n. 4, p. 707–714, 1 abr. 2019.

SUGIMOTO, K. *et al.* Fibroblast Growth Factor-2 facilitates the growth and chemoresistance of leukemia cells in the bone marrow by modulating osteoblast functions. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30779, 2 ago. 2016.

SZMAJDA, D. *et al.* Expression level of CEBPA gene in acute lymphoblastic leukemia individuals. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 15640, 30 out. 2019.

TADESSE, S. *et al.* Targeting CDK6 in cancer: State of the art and new insights. **Cell Cycle**. v. 14, n. 20, p. 3220–3230. 10 out 2015.

TERADA, K. *et al.* Usefulness of *BCOR* gene mutation as a prognostic factor in acute myeloid leukemia with intermediate cytogenetic prognosis. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 57, n. 8, p. 401–408, 26 ago. 2018.

TITO RODRIGUEZ, P. R. *et al.* Evolving Horizons in Pediatric Leukemia: Novel Insights, Challenges, and the Journey Ahead. **Cureus**, 22 ago. 2024.

TRUEWORTHY, R. *et al.* Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 10, n. 4, p. 606–613, abr. 1992.

TUONG, P. N.; KIEM HAO, T.; KIM HOA, N. T. Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Single-Institution Experience. **Cureus**, 17 jul. 2020.

WALCHER, L. *et al.* Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1280, 7 ago. 2020.

WANG, Y. *et al.*; Long-Term Results of the Risk-Stratified Treatment of TCF3-PBX1-Positive Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia in China. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 21, n. 2, p. e137–e144, fev. 2021.

WANG, Y.; ZENG, H.; ZHANG, L. ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia in China: excellent prognosis with improved BFM protocol. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 44, n. 1, p. 94, 16 dez. 2018.

WEYDEN, L. V. D. *et al.* Somatic drivers of B-ALL in a model of ETV6-RUNX1; Pax5 +/- leukemia. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 585, 13 dez. 2015.

WHITLOCK, J. H. *et al.* The landscape of SETBP1 gene expression and transcription factor activity across human tissues. **PLOS ONE**, v. 19, n. 1, p. e0296328, 2 jan. 2024.

WITKOWSKI, M. T. *et al.* Extensive Remodeling of the Immune Microenvironment in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Cell**, v. 37, n. 6, p. 867- 882.e12, 8 jun. 2020.

XUE, Y. *et al.* The role of minimal residual disease in specific subtypes of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Hematology**, v. 113, n. 4, p. 547–555, 1 abr. 2021.

XUE, Y.J. *et al.* Prognostic significance of Wilms' tumor gene 1 expression in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Frontiers in oncology**, v. 13, p. 1297870, 2023.

YEN, H. *et al.* Pediatric acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)/ *TCF3-PBX1* in Taiwan. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 64, n. 10, 24 out. 2017.

ZAPILKO, V.; MOISIO, S.; PARIKKA, M.; HEINÄNIEMI, M.; LOHI, O. Generation of a Zebrafish Knock-In Model Recapitulating Childhood ETV6::RUNX1-Positive B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancers**, v. 15, n. 24, p. 5821, 13 dez. 2023.

ZHANG, H. *et al.* Prognostic factors of childhood acute lymphoblastic leukemia with *TCF3::PBX1* in CCCG-ALL-2015: A multicenter study. **Cancer**, v. 129, n. 11, p. 1691–1703, 21 jun. 2023.

ZHANG, H. *et al.* BACH2-mediated FOS confers cytarabine resistance via stromal microenvironment alterations in pediatric ALL. **Cancer Science**, v. 112, n. 3, p. 1235–1250, 22 mar. 2021.

ZHANG, H. *et al.* Association between the Polymorphism rs3217927 of CCND2 and the Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in a Chinese Population. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95059, 17 abr. 2014.

ZHANG, X. *et al.* The Prognostic Significance of the BIN1 and CCND2 Gene in Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 38, n. 3, p. 481–491, 5 jul. 2022.

Wang, Z. e Bunting, K. D. STAT5 activation in B-cell acute lymphoblastic leukemia: damned if you do, damned if you don't. **Cancer Cell & Microenvironment**, v. 3, n. 1. Mar. 2016. <https://doi.org/10.14800/ccm.1186>.

MRC HOLLAND. **MLPA general protocol – One-tube reaction (MDP-v010)**. Amsterdam: MRC Holland, 2025. Disponível em: <https://support.mrcholland.com>. Acesso em: 6 ago. 2025.